

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Bioquímica

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN PUPAS DE
DROSOPHILA MELANOGASTER EXPUESTAS A
MICROGRAVEDAD



TESIS DOCTORAL

DAVID A. LAVÁN QUIROZ

Madrid, 2012

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN PUPAS DE
DROSOPHILA MELANOGASTER EXPUESTAS A
MICROGRAVEDAD**

Memoria que presenta para optar al grado de Doctor el Licenciado en Física
David Alfonso Laván Quiroz

Directores:
Dr. Roberto Marco Cuellar
Catedrático

Dra. Margarita Cervera Jover
Catedrático

Dr. Juan José Arredondo Lamas
Profesor Contratado Doctor

Departamento de Bioquímica/
Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols
UAM-CSIC

El Dr. Roberto Marco Cuellar, Catedrático del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid falleció el 27 de junio, 2008.

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto **ESP2006-13600-C02-01** titulado **"Experimentos biológicos en microgravedad real y simulada en el marco del programa ELIPS-2 de la Agencia Espacial Europea ESA"** del que era Investigador Principal el Dr. Roberto Marco que finalizó en Noviembre de 2009. David A. Lavan Quiróz fue financiado por una beca concedida a este proyecto (BES-2007-16173) del Ministerio de Ciencia e Innovación. La Dra. Margarita Cervera Jover fue autorizada a responsabilizarse del proyecto desde el día 20 de Octubre de 2008 hasta la finalización del proyecto por la Subdirección General de Investigación y por la Universidad Autónoma de Madrid. La Dra. Cervera y el Dr. Arredondo asumieron la dirección de este trabajo de tesis hasta su finalización.

Desde Noviembre de 2009, este trabajo fue financiado por el proyecto BFU2007-061711/BMC y BFU2010-19551 del que ha sido y es Investigadora principal la Dra. Margarita Cervera.

Los Dres Arredondo y Cervera quieren dedicar la finalización de esta tesis a la memoria del Dr. Roberto Marco Cuellar. Asimismo, quieren hacer constar el enorme esfuerzo que ha supuesto al encontrarse este trabajo fuera de su ámbito habitual de investigación. Hemos realizado este esfuerzo siempre con nuestra mejor voluntad sintiéndonos empujados, en los momentos mas difíciles, por la memoria de Roberto.

A mi hija Gabriela a Laly su madre que la ha cuidado durante todo este tiempo, a mis padres Francisco y Cecilia, a mis hermanos Rafael, Carmen, Luis, Luz, Tania, Arlis, Rosa, Susana, a la pequeña familia que forme en Madrid Esther, Madalina, Alvaro, Oihane, Ana, Alba, Marife, Belinda y Ely al Dr. Roberto Marco que fue mi guía durante todo el tiempo que estuvo con vida y un referente para mi, y a Tatiana Hervas que fue mi inspiración para la culminación de la tesis.

¿Alguna vez soñaste?
Poder ayudar a aquellos que le faltan más,
que a todos algo puedas dar
y que no quede ningún niño sin soñar.

¿Alguna vez soñaste?
Con un sueño que se realizó
con un deseo que se te cumplió
con un mañana que apareció.

¿Alguna vez deseaste?
Cerrar una herida que curó
Volver a sonreír como antes
Encontrar lo que perdiste
Conseguir lo que buscabas
Tomar lo que encontraste

Volver a empezar...
¿Alguna vez sentiste?
Un amor sin límite
Un cariño sin igual
En la fragancia de una flor
El perfume de un amor
Y el latir de un corazón.

¿Alguna vez viviste?
Con ganas de cantar
con ganas de correr
con ganas de volar.

¿Alguna vez soñaste?
Tener a alguien
en el que puedas confiar
en que te pueda ayudar
a seguir adelante
a calmar tu pesar.

Todo esto se cumple en ti
hija mía... como regalo de Dios
que no se puede medir
un amor sin igual
que no puede morir
porque nadie lo puede matar.

Mi amor hacia ti
no puede terminar
nadie lo podrá acabar,
ni el tiempo, ni el lugar.
porque es un amor
que no se puede comprender
si no, en la eternidad.

Te quiero hija mía más que a la vida misma...

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación que he realizado fue gracias a la ayuda que he podido recibir de mi gran maestro y guía Dr. Roberto Marco Cuellar durante los dos primeros años que estuve trabajando a lado de él, en el proyecto ELIPS2 de la Agencia Espacial Europea, cuyos resultados los estoy utilizando como informe en la tesis doctoral. El Dr. Roberto fue un referente, aprendí muchas cosas de él, no solo en el aspecto científico sino en lo personal. Debo de mencionar que inicialmente no acepte el tema de tesis, por aquel entonces busca tema relacionado a la tesina que presente en el máster; han transcurrido más de seis años y estoy tan involucrado en esta maravillosa área que es la microgravedad. El tiempo transcurría y me pude dar cuenta que el Dr Roberto Marco no solo era un especialista en su área sino manejaba muy bien las ecuaciones integrales y diferenciales, tenía una capacidad de poder entender los artículos de modelación de envejecimiento publicados en una prestigiosa revista para físicos teóricos (PhysicalReview A) “que suerte he tenido en conocer una persona brillante e inteligente”. Un día paso algo curioso, es por ello que siempre lo recuerdo, Roberto me estaba mirando como descascaraba la naranja con el cuchillo, después de unos minutos Roberto me dice: “David pelas la naranja igual que yo”. Pasaban los días y tuvimos unos segundos resultados preliminares del método de correlación. Recuerdo que el ordenador estuvo procesando 17 días sin detenerse. Tuvimos una correlación muy buena pero algunas nuevas graficas que no sabíamos interpretar, creo que habíamos llegado a un punto donde nos estábamos ahogando. Roberto me sorprendió cuando me comento que no sabía interpretar los resultados, fue ahí cuando ya lo notaba cansado. Una mañana fui a tomar desayuno con Roberto, note que él quería hablar conmigo, y me comento muy seriamente: “David quiero que te pongas a escribir la tesis desde ahora”. Eso me sorprendió, fue la primera vez que le respondí al DrMarco de manera rotunda diciéndole que no. El Dr Marco me comento que tenía muchos datos y sin problemas puede leer la tesis. Lo que nunca podré olvidar fue aquel día por la tarde en el restaurant que está frente del Hospital de La Paz, donde le comente que el ordenador ya había dejado de operar después de 45 días y que teníamos nuevos resultados. Le hable sobre un cluster y sobre dos pequeños grupos de genes, uno de 18 y otro de 6 a los cuales le había llamado solapantes. Yo estaba algo eufórico al comentarle, desde mi punto de vista de la ignorancia, sobre la importancia que posiblemente tenga este resultado. Después que terminé de hablarle sobre los resultados, me miró y note como se le caían las lágrimas, uno de sus hijos se puso de pié y lo abrazo y su mujer María Emilia que estaba en ese momento le cogió de las manos. Una vez el Dr Marco me dijo: “David, noto en ti una fuerza de voluntad por hacer las cosas y eso te ayudará hacer grande”. Ahora, puede entender el motivo por el cual Roberto me exigió que escriba la tesis.

Con 41 años no creo que cambie mi línea de investigación. El Dr Marco fue y será para mí una de las mejores personas que he conocido en mi vida. Este trabajo esta dedico a la memoria del Gran Dr. Roberto Marco (1941 - 2008).

Agradecer a la Dra. Margarita Cervera, no solo por haber sido la responsable del proyecto que estoy presentando como tesis, sino también agradecerle por la ayuda ofrecida en mis viajes a Perú, la estancia en Holanda y ayudarme en solucionar algunos otros problemas que se me han presentado. Por la formación que tengo me resultó un poco complicado darle forma literal al trabajo que estoy presentado como tesis doctoral, por este motivo agradezco nuevamente a la Dra Margarita Cervera y al Dr. Juan José Arredonde por el tiempo dedicado que concierne a la redacción y asesoramiento del trabajo que estoy presentando como tesis doctoral.

Agradecerle también al Dr. Raúl Herranz, Dr. Alberto Benguría, y a Javier Leandro por haber iniciado un trabajo que ha sido la base de esta tesis doctoral, a Jack van Loon por ofrecerme el uso de los equipos de microgravedad con la finalidad de poder validar los resultados, Dr. Jesús Cruces por darme la idea de estudios de factores de regulación, Dr. José Sánchez por haber ayudado en el desarrollo del algoritmo de correlación y agradecer al Dr. Rafael Garesse que me ha ayudado en muchas ocasiones; quiero mencionar que cada vez que me cruzo por el pasillo con el Dr. Garesse me da la impresión de ver a mi gran maestro y Guía Dr. Roberto Marco.

También tengo que agradecer a dos grandes personas que me inclinaron por el camino de la investigación, los Drs Hans Nowak y EleckKarsay, el primero de ellos en la física del estado sólido y el Dr. Karsay en modelaciones biofísicas. Agradecer a todos mis amigos del máster de biofísica. Como no agradecer al Dr. Patricio Sanz quien me dio la oportunidad de trabajar en la oficina española de patentes y marcar como becario. En este trabajo conocí a un pequeño grupo de amigos, entre ellos a Luis, Pedro, Pablo, Bertha, Belén, Isidro, el gran Dani con el cual parábamos horas charlando de ciencia y Nacho a quien he visto con mayor frecuencia después de haber renunciado a patentes. El tiempo transcurría y comencé a conocer más gente en el pasillo del departamento de bioquímica, entre ellos a mi gran amigo Jorge Vivarquien no solo me ayuda en solucionar problemas cotidianos que se me presentaban en los experimentos sino filosofábamos de los resultados que obtenía durante largas horas por la noche en el laboratorio, casi siempre acompañados de nuestro gran amigo El Chino.

Como sabéis, yo tengo formación de física, nunca he tenido la experiencia de trabajar en bioquímica, pero gracias a mis amigos que fueron parte del B20 y de los que aún quedan, me han ayudado a perder ese miedo de estar frente de una poyata, entre ellos tengo que agradecer a Lucia que tiene una manera genial de enseñar, también tengo que reconocer la ayuda que he

recibido por parte de Maricruz en el desarrollo de la segunda etapa de la tesis, Maricruz "*Para un físico un elefante es un punto en el Espacio que se mueve bajo ciertas condiciones del medio*", Raquel Chamarro y Carlos Díaz por ayudarme a resolver mis inquietudes en este mundo maravillosos de la bioquímica, agradecer también a Lety, Pedro, Begoña, Bertha, María y Marcos del B17 por su apoyo incondicional en algunos favores que les he pedido durante mi estancia en el laboratorio.

Por el pasillo también pude conocer a Cristina del B17, amiga de mi amigo el "mecánico", Susana una excelente persona quien me ayudo en la manipulación de las *Drosophila melanogaster*, a Paula que inicialmente me imaginaba que era persona algo peculiar, pero cuando la llegue a conocer aquel 19 de febrero del 2010 en la reunión que realicé por mi cumpleaños pude conocer a la otra Paula. Ella me ayudo analizar las qRT-PCR, gracias Pau por tu ayuda, agradecer también a Lucia del B19 que hace muy poco se ha doctorado, agradecer también a María y Milena, Verónica, a Manu y Ana Confocal con los cuales hemos pasado momentos de alegría, agradecer también a Gonzalo por los gratos momentos que pasamos durante el viaje a Florencia quien mi hizo famoso en aquel viaje con "el payasito". Agradecer a Carmen y Mercedes que se han incorporado en los últimos años al departamento con las cuales hemos compartido junto con Madalina y Esther los desayunos, comidas y algunas cenas. Agradecer a las jóvenes madres del B19 Rosana y Cristina por las ayudas que me han brindado. También tengo que agradecer al dúo, se comprenden tanto, como si fuera una delantera de un equipo de futbol, mis dos grandes amigas Anita y Albita que gracias a ellas, a Pedro Pablo, Oihane y a Tatiana el proyecto de ayuda a Mali con medicinas se hizo realidad. Agradezco también a mis amigos del IIB Dani, Javi, Sara, Fabio y Lucia. Como no mencionar dentro de este grupo al terrible, seductor, al incomparable doc Sergio Carilla mi compi de piso.

También tengo que agradecer a la madre de Madalina por invitarme a pasar la navidad del 2010 en su casa y por las tarteras de comida que me enviaba, señora le agradezco de todo corazón por estos lindos gestos tan bonitos hacia mi persona. También tengo que agradecer a los padres de Esther por preocuparse por mí durante todo este tiempo que nos hemos conocido. Agradecer a Andrés y Gerardo por los agradables momentos que hemos pasado junto a Madalina y Carmen. Agradecer también a Lourdes, mamá de Oihane y su padre como también a los padres de Alvarito que siempre preguntaban por mí. Agradecer también a mis dos queridas amigas Vero y Rocío, con quienes hemos compartido agradables momentos como cenas cine y teatro, agradecer a Alexia y a su hermana Goretti por la ayuda ofrecida durante mi estancia en Holanda. Por último agradecer Xavier, Antonia, María de Vigo, María Jesús, Macu, Francisco, José y Martina Belmar, Carmen y Puri.

RESUMEN

En 2003, con el experimento GENE de la misión espacial Cervantes, se planteó estudiar el transcriptoma de las pupas de *Drosophila*. La metamorfosis de la pupa que finaliza con la emergencia del adulto. En esa etapa, de aproximadamente cinco días, la pupa sufre grandes cambios metabólicos, fisiológicos y además la organogénesis. La hipótesis inicial era que solo un número pequeño de genes responderían a ausencia de gravedad como se había identificado en sistemas unicelulares. En este trabajo se presenta un análisis del transcriptoma de las pupas del experimento GENE (14.010 genes), mediante el método de correlación, que procede de la fusión de los algoritmos MAS5 y R-AffymGui y fue puesto a punto en el transcurso de este trabajo. El análisis del transcriptoma demuestra que los patrones de respuesta a gravedad son realmente mucho más complejos de lo esperado. Se ha determinado que al menos 806 genes de *Drosophila*, estadísticamente diferenciables, sufren cambios significativos en su expresión en respuesta a microgravedad real (ISS) y simulada (RPM). La aplicación del método de correlación permitió identificar un grupo de seis genes: ImpL3, DnaJ-1, CG4726, CG18431, CG14598 y CG5326, que sufren una reducción de su expresión de entre 2-3 veces. Se ha demostrado que la respuesta a microgravedad de estos genes es debida a la exposición a microgravedad aunque la exposición al frío (14°C) aumenta este efecto. La comparación entre los resultados obtenidos en los experimentos en la Estación Espacial Internacional y los que se obtuvieron en tierra con la máquina de posiciones aleatorias (RPM) demuestran que este último es un buen simulador de microgravedad.

En la segunda parte del trabajo se ha procedido a caracterizar estos genes. Sus patrones de expresión espacio-temporal embrionaria y sus funciones no son coincidentes. Sin embargo, el perfil de expresión en pupas tempranas es similar. Se ha identificado un sitio de unión potencial para el factor de transcripción BRC-Z4, conservado en elementos reguladores de los seis genes. Este factor juega un papel importante en el inicio de la metamorfosis que es cuando estos genes presentan un pico de expresión.

SUMMARY

In 2003, the GENE experiment main goal in space mission Cervantes was to study the *Drosophila* pupae transcriptome. In metamorphosis, after pupae physically develop, the process ends in five days with fly emergence. The process involves important metabolic and physiological changes, and also organogenesis. As was identified in unicellular systems, the initial hypothesis for the GENE experiment was that only a small number of genes respond to microgravity. This work presents a transcriptome analysis of the pupae GENE experiment. Data analysis obtained through a microarray expression assay of 14,010 genes, was performed using a correlation method that implements previous used algorithms MAS5 and R-AffyLmGui (Herranz, Benguria et al., 2010). Transcriptome analysis shows that patterns of gravity response are actually much more complex than expected. It has been determined that at least 806 *Drosophila* genes, statistically distinguishable, undergo significant changes in expression in response to real microgravity (ISS) and simulated (RPM). Applying the correlation method a group of six genes was identified: ImpL3, DnaJ-1, CG4726, CG18431, CG14598 and CG5326, which decrease 2-3 times expression levels. It has been demonstrated that microgravity response of these genes is due to exposure to microgravity although exposure to cold (14 ° C) increases this effect. Moreover, comparison between results obtained in experiments on the International Space Station and in the random position machine (RPM) show that the latter is a good microgravity simulator.

In the second part of this work we have proceeded to characterize these genes. Spatio-temporal embryonic expression patterns and functions are not overlapping. However, early pupae expression profiles are similar. We have identified a potential binding site for BRC-Z4 transcription factor, conserved in the regulatory elements of the six genes. This factor plays an important role in the onset of metamorphosis that is when these genes show a peak expression.

ABREVIATURAS

AB	: Applied Biosystems
ATP	: Adenosín trifosfato
BDGP	: Berkeley Drosophila Genome Project
Brc-Z	: Broad complex zinc-Z
CDTT	: Centro de Desarrollo Tecnológico e Industria
Cf2-II	: Chorion factor 2
Cy	: Cyanine
DEPC:	: Dietil Pirocarbonato
Dfd	: Deformed
DH5α	: Células competentes DH5α
dl	: Dorsal
dNTPs	: Deoxyribonucleotido Trifosfatos
EC	: Enzyme Commission numbers
EDTA	: Etilen diamino tetracético
ESA	: Agencia Espacial Europea
ESTEC	: European Space Research and Technology Centre)
GTFs	: Factores de Transcripción generales
Hybe	: Solución de Hibridación
Hybe-B	: Tampón de Hibridación
HSF	: Heat shock factor
IBMP	: Instituto para problemas Biomédicos de Moscú
IML-1,2	: International microgravity Laboratory - 1,2
IMPL3	: Gen inducible por Ecdnisona L3
ISS	: International Space Station
LBA	: Medio de cultivo Luria Bertani Agar
LCD	: Centrifuga de diametro grande
LDH	: Lactato dehidrogenasa
MAMBA	: Breaker Motorizado Ampolla Asamble
MAS5.0	: Micro Arrays Analysis Suite 5.0
Mef2	: Myocyte enhancer factor 2
mL	: Mililitros
MM	: Mismatch
NASA	: National Aeronautics and Space Administration.
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NTB	: Nitro Blue Tetrazolium Chloride
PBS	: Solución tamponada con fosfatos
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
bp	: pares de base
PM	: Perfect match
qRT-PCR	: RT-PCR cuantitativa
RMA	: Robust Multiarray Averaging
RPM	: Random positioning machine
RT	: Transcripción en reverso
SDS	: Dodecil-Sulfato Sódico
TAE	: Tris-acetate-EDTA
TBS	: Solución tamponada con Tris-HCl
TF (IA, B, C)	: Factores de transcripción (IA, B, C)
TIFF	: Tagged Image File Format
UCSC	: Universidad de Santa Cruz de California - Unidad de Bioinformática

INDICE

RESUMEN.....	1
SUMARY.....	2
ABREVIATURAS.....	3
ÍNDICE.....	4
1 INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 La importancia de estudiar la gravedad en sistemas biológicos.....	8
1.2 Ciclo de vida de <i>Drosophila melanogaster</i> y sus ventajas en el estudio de la biología espacial.	
1.3 La investigación espacial en sistemas biológicos.....	11
1.4 Misión Cervantes.....	13
1.4.1 Experimento Gene.....	13
1.5 El proceso de transcripción y su regulación.....	16
1.6 Estudio de perfiles de expresión por microarrays.....	18
2 OBJETIVOS.....	21
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1 Materiales.....	23
3.1.1 Cultivo de <i>Drosophila melanogaster</i>	23
3.1.2 Líneas de <i>Drosophila melanogaster</i>	23
3.1.3 Oligonucleótidos.....	23
3.1.4 Cepas bacterianas.....	25
3.1.5 Plásmidos.....	25
3.1.6 Hardware.....	25
3.1.6.1 Hardware.....	25
3.2 Métodos.....	26
3.2.1 Método de Correlación.....	26

3.2.2	Análisis de Microarrays.....	26
3.2.3	Análisis de Secuencias.....	27
3.2.4	RT-PCR y qRT-PCR.....	27
3.2.5	RT-PCR.....	27
3.2.6	qRT-PCR.....	28
3.2.7	Marcaje de Sondas de RNA.....	28
3.2.8	Métodos de <i>Drosophila</i>	28
3.2.9	Recogida y fijación de embriones.....	29
3.2.10	Hibridación In-Situ.....	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Resultados.....	31
4.1.1	Análisis de datos según el programa MAS 5.0.....	31
4.1.2	Análisis de datos según el programa informático R-AffymGUI.....	33
4.1.3	Comparación entre algoritmos MAS 5.0 y R-AffymGUI.....	34
4.1.4	Análisis de datos mediante el método de correlación.....	36
4.2	Estudios de los seis genes solapantes.....	40
4.3	Análisis de expresión temporal en embriones.....	48
	IMPL3.....	49
	CG4726.....	51
	CG14598.....	52
	CG5326.....	52
	Dnaj-1 y G18431.....	52
4.4	Validación en microgravedad simulada del experimento GENE.....	54
5	DISCUSIÓN	59
5.1	La gravedad en el proceso de desarrollo.....	60

6	CONCLUSIONES	70
7	BIBLIOGRAFÍA	72
8	ANEXOS	80
	A. Diagrama de flujo del algoritmo para determinar la lista de genes que tienen poca variabilidad en la señal.....	81
	B. Diagrama de flujo del algoritmo para determinar la lista de genes que tiene poca variabilidad en la señal al comparar el grupo experimental vs el grupo control	82
	C. Diagrama de flujo del algoritmo del método de Correlación.....	83
	D. Publicaciones (D.Lavan)	84

INTRODUCCIÓN

1.1 LA IMPORTANCIA DE ESTUDIAR LA GRAVEDAD EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

La fuerza de la gravedad se define como la fuerza ejercida por los cuerpos en función de su masa. Newton afirmó que todo objeto que posee masa ejerce una atracción gravitatoria sobre cualquier otro objeto con masa, más allá de la distancia existente entre ambos. A mayor masa, mayor fuerza de atracción; por otra parte, a mayor cercanía entre los objetos, mayor fuerza de atracción. El término “gravedad” se utiliza para designar la intensidad del fenómeno gravitatorio en la superficie de los satélites. En el siglo XVII, Isaac Newton fue el primero en exponer que es de la misma naturaleza la fuerza que hace que los objetos caigan con aceleración constante en la Tierra (gravedad terrestre) y la fuerza que mantiene en movimiento los planetas (Newton, I, 1687 *Philosophiae naturalis principia mathematica*).

En el espacio, la gravedad y radiación son individualmente los dos factores medioambientales alterados. La gravedad, es una fuerza de interacción débil que crea un campo potencial permanente que actúa sobre los sistemas biológicos y también sobre estructuras y componentes celulares. Esta fuerza está fuertemente reducida en el espacio. Los seres vivos como sujetos con masa que habitan en la superficie de la tierra reaccionan frente a la presencia o ausencia de la gravedad. Esto es especialmente evidentemente en el caso de las plantas, pero también ocurre en el caso de los animales e incluso en los organismos unicelulares como demuestran los estudios con sistemas de cultivo celular o con protozoos. Se conoce toda una serie de componentes moleculares que detectan las fuerzas y deformaciones mecánicas de las células y de los tejidos, algunos más especializados como los estatolitos existentes en las plantas (Perbal and Driss-Ecole 2002) ó estructuras equivalentes en protozoos, pero en cualquier caso parece claro que la detección de las fuerzas gravitacionales, bastante débiles por sí mismas, pasa por modificaciones más generalizadas en el conjunto de la célula en el que intervienen los canales iónicos sensibles a estímulos mecánicos, cambios citoesqueléticos, etc. Su descripción es aún incompleta como la mayoría de los procesos fenotípicos que ocurren en los organismos vivos y que han sido optimizados durante la evolución. Por otra parte la forma cómo estos parámetros afectan los procesos concretos de comportamiento celular y su integración en el desarrollo sigue sin conocerse bien. En la biología espacial, el objetivo esencial es avanzar en esa dirección. La disponibilidad de métodos de alto rendimiento en Biología hace posible estudiar hoy cuál es la respuesta de los sistemas vivos a las condiciones gravitatorias en la Estación Espacial Internacional (ISS), la Luna o Marte. Además de profundizar en el estudio de algunos de estos parámetros, sería importante contribuir a resolver la paradoja actual que existe en el campo. Mientras es relativamente sencillo identificar y estudiar las alteraciones en diversos parámetros celulares (citoesqueleto, proliferación, señalización etc) que intervienen en la

detección y respuesta de los estímulos gravitatorios y mecánicos, los sistemas multicelulares complejos, tanto vegetales como animales, son capaces de compensar los cambios que ocurren en sus células y tejidos y completar de forma aparentemente normal el desarrollo en el espacio (De Maziere, Gonzalez-Jurado et al. 1996; Kordyum 1997; Katembe, Edelmann et al. 1998; Aimar, Bautz et al. 2000; Ferl, Wheeler et al. 2002; Marco, Husson et al. 2003; Perbal and Driss-Ecole 2003). Todos presentan un desarrollo final aparentemente normal. En algún caso como los anfibios, se han descrito alteraciones en los procesos de blastulación y neurulización, pero al final su desarrollo es normal (Souza and Black 1985). Los insectos y más concretamente *Drosophila*, por su resistencia, pequeño tamaño y corto ciclo de vida han sido uno de los pocos sistemas donde se ha podido estudiar el proceso de desarrollo completo en el espacio, incluso iniciar estudios multigeneracionales (Sanchez, Shenasa et al. 2005). En la Estación Espacial Internacional, a pesar de las dificultades en controlar su ambiente, se intentó realizar un experimento de desarrollo de plantas (*Arabidopsis*) y seguir el desarrollo hasta una segunda generación. Los resultados parecen indicar dificultades en conseguir mantener la viabilidad durante sucesivas generaciones de esta especie (Musgrave and Kuang 2001).

1.2 CICLO DE VIDA DE *DROSOPHILA* Y SUS VENTAJAS EN EL ESTUDIO DE BIOLOGÍA ESPACIAL

En las primeras décadas del siglo XX se vivió un momento de búsqueda de nuevos modelos experimentales, que sirvieran como sujeto de estudio para la consolidación y avance en los estudios en el área de la biología. Uno de los animales ensayados con este propósito fue *Drosophila melanogaster* (Castle 1906).

Los insectos son una de las clases de animales más evolucionados. El hecho de que el desarrollo temprano ocurra en el embrión sincitial hace de *Drosophila* un sistema ideal para estudiar los efectos de cambios de gravedad en sus inicios y por tanto lo hace un modelo de elección para los experimentos en el espacio que pretenden preguntarse cuáles son los cambios y moléculas afectadas en ausencia de la gravedad (Vernos, Carratala et al. 1989).

La mosca del vinagre entró por primera vez en el laboratorio como un buen sistema para las prácticas de los programas universitarios. Este hecho se basaba en su tamaño reducido, pero fácilmente observable en la lupa, un tiempo de generación corto (figura 1), un gran número de descendientes por generación y, sobre todo, la simplicidad u economía de los medios necesarios para su cultivo (Kohler 1993).

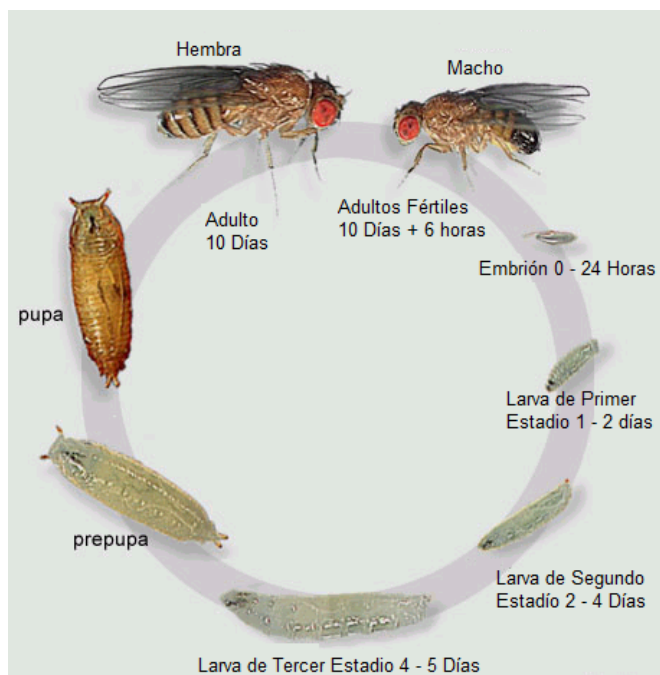


Figura 1. Esquema del ciclo vital de *Drosophila*. *Drosophila* posee un ciclo vital dividido en dos fases. El desarrollo embrionario dura unas 24 horas. A continuación emerge la larva que pasará por tres estadios larvarios. A los cinco días del inicio del desarrollo, comienza la pupación de la larva y se histolizan la mayoría de los tejidos. La morfología del adulto se genera a partir de nuevos tejidos formados, los discos imaginales. El adulto emerge del pupario aproximadamente al décimo día (Campos-Ortega and Hartenstein 1985)

Drosophila es un insecto holometábolo, que presenta dos estadios diferenciales, el embrionario-larvario y el adulto, separados por una etapa de metamorfosis. El desarrollo embrionario dura aproximadamente 24 horas a 25 °C (Campos-Ortega and Hartenstein 1985; Bate and Martines 1993), y tras este periodo emergente la larva, que pasará por tres estadios larvarios mudando dos veces la cutícula. A los cinco días de desarrollo comienza la pupación de la larva, donde se produce la histolización de la mayoría de los tejidos larvarios. Los tejidos adultos se forman principalmente a partir de los discos imaginales. El individuo adulto emerge aproximadamente el décimo día y su reproducción será posible a partir de las 6-8 horas siguientes. *Drosophila* presenta muchas ventajas frente a los vertebrados a la hora de estudiar regulación y expresión génica. Su genoma está completamente secuenciado en 12 de las especies: *D. melanogaster* (Adams, Celniker et al. 2000) y *D. pseudoobscura* (Richards, Liu et al. 2005), y mas recientemente se han secuenciado las otras especies (Clark, Eisen et al. 2007). La secuenciación de todas estas especies ha facilitado el estudio filogenético de los genes, y de sus regiones reguladoras (Peterson, Jurjevic et al. 2010). La mayor parte de los genes en *Drosophila* son de copia única (Bernstein, O'Donnell et al. 1993), mientras en vertebrados casi todos están codificados por familias multigenéticas, como es el caso de la miosina con más de 11 genes (Emerson and Bernstein 1987; Schiaffino and Reggiani 1996). Además, los mecanismos básicos que controlan la diferenciación están conservados en *Drosophila* y vertebrados (Scott, Collins et al. 1994). Existen numerosos mutantes (<http://fly.bio.indiana.edu/>, Bloomington Stock Center) tanto para genes que codifican proteínas estructurales, como para los factores de transcripción ó moléculas de señalización implicados en los múltiples procesos durante el desarrollo embrionario. Hoy en día, *Drosophila melanogaster* es un organismo muy bien caracterizado, con una batería de herramientas que permiten la

detección de cambios moleculares y genéticos a cualquier tipo de estrés (del Valle Rodriguez, Didiano et al. 2011).

1.3 LA INVESTIGACIÓN ESPACIAL EN ESPAÑA EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

Los primeros trabajos publicados en *Drosophila* para analizar los efectos biológicos después de someterlas a cambios de gravedad fueron los que realizó Elizabeth E. Brown en 1977, exponiendo moscas a hiper-gravedad (x670g) durante seis horas (Brown and Schubiger 1977). En estos experimentos se demuestra que los embriones que emergieron de las moscas tratadas parecen tener un desarrollo normal pero que las larvas eran incapaces de moverse. Una típica anomalía fue la fusión de los segmentos, siendo más frecuentes en la región media de la larva (segmentos 6-9).

Los primeros experimentos realizados en el espacio usando *Drosophila* (Parfyonov, Platonova et al. 1979; Miquel and Fleming 1984) en las instalaciones americanas de la NASA parecían indicar que el desarrollo de este insecto podía proceder normalmente en ausencia de gravedad. Se observó una aceleración del envejecimiento en las moscas jóvenes adultas expuestas a vuelos espaciales de veinte días, concretamente en el COSMOS 936. Sin embargo, el tipo de experimentos posibles en aquellos momentos en el espacio hacían muy difícil obtener datos cuantitativos (Miquel and Philpott 1978). En 1980, el Dr. Roberto Marco, pionero de la investigación espacial en España, inició una serie de experimentos usando *Drosophila* como modelo. Estos experimentos fueron también, hasta cierto punto preliminares, ya que era muy difícil llevar a cabo los controles necesarios (Marco, Vernos et al. 1983). En 1985, ya se pudieron completar estos experimentos usando el laboratorio biológico espacial BIORACK desarrollado por la Agencia Espacial Europea (ESA) que realizó un vuelo de 7 días y que permitía controlar mejor las condiciones ambientales y experimentales. El objetivo de estos experimentos fue conocer los efectos de las fuerzas gravitacionales, en concreto, de la microgravedad sobre la embriogénesis y el envejecimiento (Marco, Vernos et al. 1986; Vernos, Gonzalez-Jurado et al. 1989). Los resultados indicaron que aunque el embrión se desarrolla correctamente en ausencia de la gravedad, presentan pequeñas alteraciones. El estudio de las moscas y embriones enviados permitió sugerir que se generaba una alteración en la deposición de la información materna, particularmente la que utiliza el embrión en la organización de su región anterior. Adicionalmente, se apreció un incremento de n° y tamaño de los embriones depositados en el espacio (Marco, Vernos et al. 1986; Vernos, Gonzalez-Jurado et al. 1989). España, volvió a participar en este tipo de estudio, enviando de nuevo larvas, en septiembre de 1989, en el biosatélite soviético Biokosmos-9 ("Fly experiment") y también en 1992 en la misión IML-1. El "Fly Experiment" y la misión IML-1 que estaban codirigidos por los Dres Marco y

Miquel (Marco, Gonzalez-Jurado et al. 1992; Marco, de Juan et al. 1994). Se pretendía estudiar el envejecimiento usando *Drosophila*. Ninguno de los experimentos fueron concluyentes. En el “Fly-Experiment” se debió a la imposibilidad de recuperar individuos adultos después del vuelo. Se estudio la descendencia de los embriones recuperados tras el vuelo. Concretamente se realizó un análisis de dos funciones que cambian con el envejecimiento, la geotaxis negativa, o respuesta innata para el vuelo de escape vertical, y la capacidad copulativa máxima por hora de los machos (Armstrong, Texada et al. 2006). Ambos parámetros mostraban una caída progresiva con la edad, más acusada en los ejemplares de vuelos que en los de tierra. La participación del metabolismo mitocondrial también fue afectada, observándose una mayor disminución en el 16S RNA ribosómico mitocondrial en microgravedad respecto a las moscas controles colocadas en tierra. Complementario a estos experimentos se observó también un significativo decrecimiento de la vida media de las moscas jóvenes expuestas a microgravedad durante varios días. Las hembras jóvenes y los machos y hembras mas viejos no presentaban este efecto (Marco, Gonzalez-Jurado et al. 1992; Marco, de Juan et al. 1994). Tras mejorar el diseño de los experimentos y grabar el estado motil de las moscas durante el vuelo de 14.5 días en la misión IML-2 y posteriormente en las misiones Fotón 10 y 11 que se realizaron entre 1995 y 1997 se pudieron confirmar los resultados. Se concluyó que en el espacio, en ausencia de gravedad hay una estimulación de la oogenesis y que el desarrollo está ligeramente retrasado al compararlo con moscas control crecidas en paralelo en gravedad normal (x1). También se confirmó la correlación que existe entre el incremento de la actividad locomotora en microgravedad, especialmente en machos jóvenes y el aumento del deterioro funcional y mitocondrial, es decir se producía un incremento del metabolismo y daño mitocondrial durante el proceso de rápido envejecimiento de las moscas jóvenes (Marco, Diaz et al. 1999). Todos estos resultados presentan de nuevo la paradoja de que sistemas simples unicelulares presentan mas alteraciones en procesos fundamentales de señalización que sistemas más complejos pluricelulares como *Drosophila* (Benguria, Grande et al. 1996; Marco, Benguria et al. 1996).

En resumen, las conclusiones mas importantes de todos estos experimentos han sido que es posible el desarrollo normal de embriones a partir de huevos formados enteramente en microgravedad sobre la ovogénesis, ya que el número de larvas y adultos en los contenedores de vuelo fue el doble que en los de los controles. Además, la mayoría de los adultos emergidos no presentaban características morfológicas anómalas, y la proporción de machos y hembras era muy similar (a lo esperado?) lo que supone una ausencia de mutaciones letales provocadas por la radicación espacial (Marco, Gonzalez-Jurado et al. 1992).

1.4. MISIÓN CERVANTES

En la década de los 90, ya se tenía conocimientos del uso de los chips de ADN para estudiar la expresión de diversos genes en un tiempo relativamente corto (Schena, Shalon et al. 1995). La siguiente meta que ahora ya era posible, era plantearse en el mundo de la biología espacial era la de identificar los genes “sensores” cuya expresión pudiera estar implicados en detectar los cambios de gravedad. La hipótesis planteada era que los productos de estos genes cambiarían su expresión ante situaciones de microgravedad. Se buscaba establecer la naturaleza de la respuesta biológica a una exposición prolongada a la microgravedad. Con ese objetivo se pudieron en marcha los experimentos GENE y AGEING dirigidos ambos por el Dr. R. Marco, que se llevaron a cabo durante la misión Cervantes junto con otros experimentos que formaban parte de un amplio programa y que fue aprobado y organizado por la Agencia Espacial Europea ESA. La misión Cervantes ó “Misión Soyuz Española”, tuvo lugar en octubre de 2003. El ministerio de Ciencia y Tecnología, a través del Centro de Desarrollo Tecnológico e Industrial (CDTI), financió el costo del vuelo del astronauta Pedro Duque, dentro del marco de acuerdo firmado por la ESA y la agencia espacial rusa, Rosaviakosmos. Este acuerdo, firmado en mayo de 2001, abrió la puerta a que astronautas europeos volasen a la Estación Espacial Internacional (ISS) (van Loon, Medina et al. 2007). Los experimentos españoles de la misión Cervantes buscaban: 1) identificar los genes implicados en la respuestas a microgravedad y estudiar su regulación (GENE) y 2) estudiar el efecto de la microgravedad sobre la actividad y longevidad de los organismos vivos expuestos a ella durante periodos prolongados (AGEING) (de Juan, Benguría et al. 2007; Herranz, Benguria et al. 2010).

1.4.1 EL EXPERIMENTO GENE

A continuación, se describe el experimento GENE completo, una parte de cuyos resultados han sido analizados durante el desarrollo de estas tesis.

El experimento GENE como ya se ha comentado arriba pretendía identificar los genes implicados en la respuesta a microgravedad para, posteriormente, estudiar su regulación. Brevemente, se expusieron varios grupos de pupas tempranas a microgravedad durante 3 días y medio en la Estación Espacial Internacional (ISS). Posteriormente, ya en tierra, se analizaron los perfiles de expresión génica de estas muestras mediante ensayos de microarrays. Paralelamente, los mismo experimentos fueron realizados en tierra en condiciones de gravedad normal y microgravedad simulada. Estos experimentos se realizaron en las simuladores de microgravedad en tierra (RPM) ubicados en las instalaciones de la Agencia Espacial Europea (ESA, Holanda) (Herranz, Benguria et al. 2010).

El experimento fue realizado bajo las estrictas condiciones de seguridad impuestas por la ESA. Por tal motivo, el experimento tuvo que quedar totalmente preparado y puesto dentro de un contenedor sellado antes del despegue. Por tanto, antes de la realización del experimento, el contenedor Berlingot (Tixador, Richoilley et al. 1981) tuvo que ser adaptado a las condiciones exigidas por la ESA. El Berlingot es una cámara de cultivo que fue colocada dentro de una bolsa de plástico sellada con dos capas de polietileno (figura 2). Las muestras se encontraban dentro de una bolsa de plástico de doble capa que contiene una ampollas de vidrio que contiene fijador (figura. 2). La rotura de las ampollas libera el fijador sobre los especímenes en estudio. En la Agencia Espacial Holandesa (Leiden, Países Bajos) se diseñó un sistema automatizado para romper las ampollas de vidrio en las horas preestablecidas, usando el hardware MAMBA.

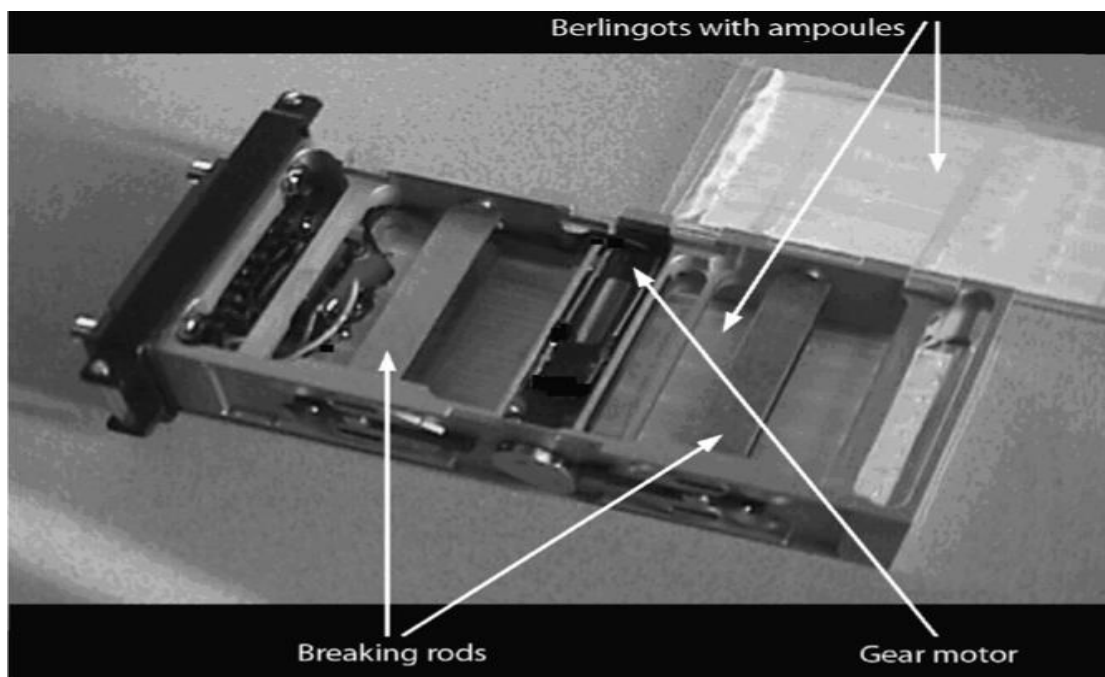


Figura 2. El equipo de Berlingot. Sus medidas son 9x4x2 cm. Imagen editada del original (Leandro, Szewczyk et al. 2007).

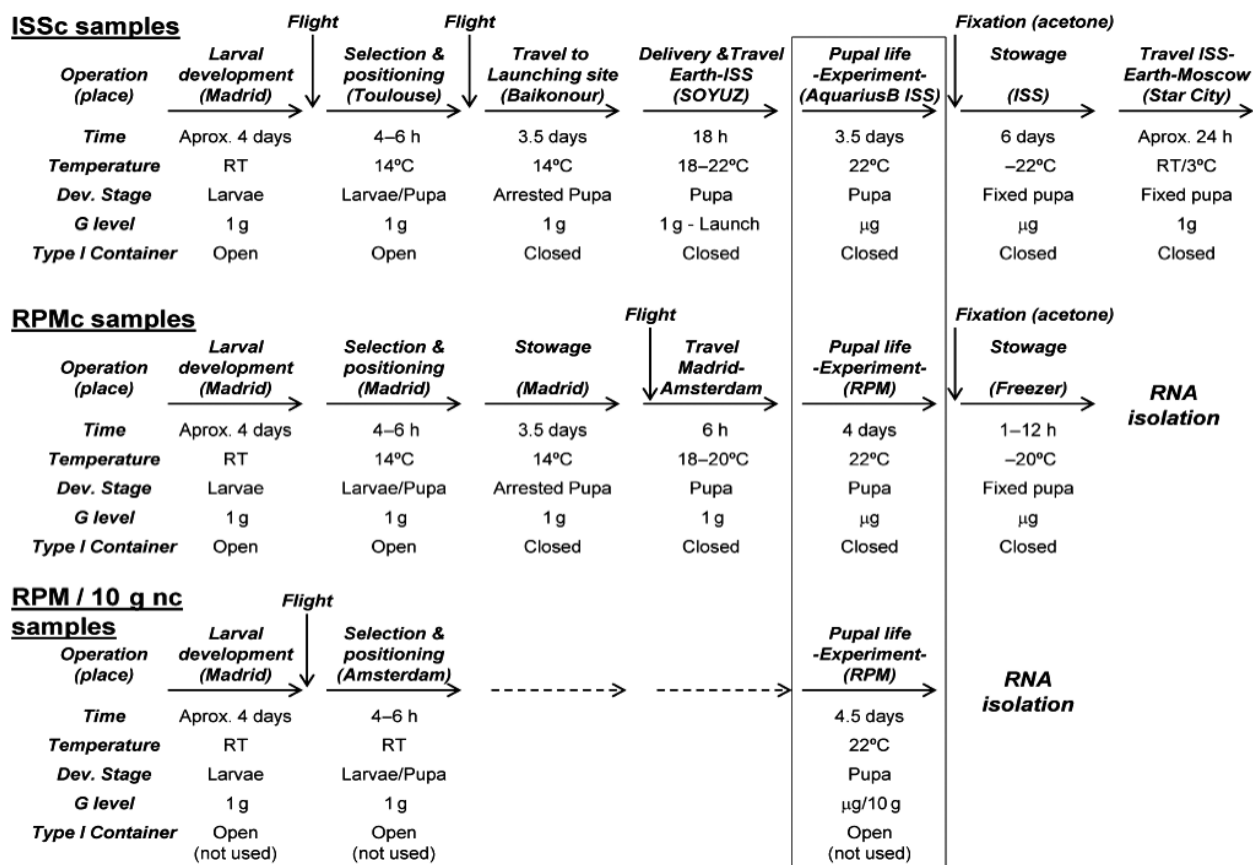


Figura 3. Descripción detallada de los cuatro experimentos expuestos a diferentes niveles de gravedad. Se incluye la preparación, el transporte, la exposición y la recuperación de las muestras se describen junto con los parámetros ambientales (duración, temperatura, niveles de gravedad). Figura extraída de Herranz, Benguría et al 2010.

Para realizar el experimento, se prepararon 4 contenedores MAMBA, cada uno de los cuales contenía 2 Berlingots. Dos de los contenedores fueron enviados a la estación espacial mientras que los otros dos permanecieron en tierra. Ambos grupos se prepararon a la vez y exactamente en las mismas condiciones, estando ambos sincronizados. Debido a las limitaciones en el espacio disponible para el experimento en la Estación Espacial Internacional, se tuvo que limitar el experimento a una sola etapa de desarrollo, la pupa. La elección de esta etapa se debió principalmente a que en condiciones normales, a 22 °C de temperatura, la pupa tarda aproximadamente 5 días en desarrollo, un intervalo temporal que se ajustaba perfectamente al tiempo de duración del vuelo. Además en este periodo las moscas no requieren ningún aporte externo, únicamente oxígeno, lo que facilita mucho la realización del experimento en el espacio. Debido a que el proceso de preparación de las muestras era relativamente complicado y requería del uso de equipos delicados que no estaban disponibles en Baikonur (Kazajstán), las muestras se mantuvieron a 14°C hasta su llegada a la Estación Espacial Internacional. A priori, esto no debería suponer ningún problema ya que *Drosophila* puede sobrevivir a temperaturas relativamente mas bajas de la habitual (Anthony, Ausseil et al. 1996). En estas condiciones, el proceso de desarrollo es normal pero más lento, lo que facilita su transporte hasta Kazajstán y Holanda. Después del lanzamiento, las muestras se mantuvieron

en microgravedad, real o simulada, y temperatura normal, 20°C, en la capsula del Soyuz y 22 °C en la Estación Espacial Internacional, durante tres días y medio. Veinte larvas y pupas silvestres la cepa *Oregon* fueron colocadas en el centro de un papel filtro de $3,2 \times 10,0$ cm². Se seleccionaron larvas de la pared del tubo próximas a la pupación y se transfirieron a un papel de filtro donde puparon. Las ampollas de vidrio se llenaron con acetona, el fijador elegido, a baja presión (Tixador, Richoilley et al. 1981). Se colocaron veinte ampollas dentro de cada bolsa, cada una de las cuales contenía 30,0 ml de acetona. Las pupas contenidas en cada Berligot fueron fijadas por tanto con un total de 0.6 ml de acetona. La acetona deshidrata los tejidos a través de la gruesa cutícula de las pupas a imagos, preservando el RNA y las proteínas de las muestras. Una vez evaporada la acetona las muestras se congelaron a -20°C, permaneciendo así hasta el final de la misión. Tras su regreso a la tierra, los contenedores se colocaron a 3°C inmediatamente después del aterrizaje. Una hora después, los contenedores fueron abiertos y se llevo a cabo la homogenización hasta su procesamiento en el laboratorio de Madrid. Paralelamente se realizó el mismo experimento en condiciones de gravedad simulada en ESTEC (figura 3). El mRNA extraído de las muestras fue hibridado en chips de Affymetrix y los datos obtenidos fueron procesados y analizados siguiendo las recomendaciones del fabricante (www.affymetrix.com/support/technical/whitepapers/sadd_whitepaper.pdf). A partir del año 2005 se publicaron los primeros resultados preliminares producto del experimento GENE (Herranz, Benguria et al. 2005; Herranz, Laván et al. 2007; Herranz, Laván et al. 2009).

1.5 EL PROCESO DE TRANSCRIPCIÓN Y SU REGULACIÓN

La expresión génica es el proceso mediante el cual se transfiere la información contenida en la secuencia del DNA, hasta una secuencia de proteína utilizando RNA como intermediario (figura 4). Durante la transcripción las secuencias de DNA se transcriben en copias de mRNA por la RNA polimerasa. En eucariotas superiores, prácticamente todos los mRNA sufren un proceso de maduración, mediante el que se eliminan los intrones y se unen los exones para formar los mRNA maduros. Posteriormente, estos mRNA son traducidos a proteínas usando la maquinaria de traducción en la que los ribosomas y los tRNA tienen un papel esencial. Tanto la transcripción como la traducción son dos procesos altamente regulados. Protagonistas importantes en el proceso de transcripción son las RNA polimerasas, los promotores y los elementos reguladores o “enhancers” de cada gen. En el proceso de transcripción, tienen un papel fundamental los factores de transcripción que se unen a estos elementos reguladores y son, entre otros, responsables de su actividad transcripcional (Guasconi and Yahi 2003).

Las RNA polimerasas son proteínas de elevado peso molecular, formadas entre 8 y 14 subunidades y cuya masa molecular es mayor de 500 kd. En eucariotas hay tres tipos de RNA polimerasas que difieren en su especificidad hacia el molde, su localización en el núcleo y su

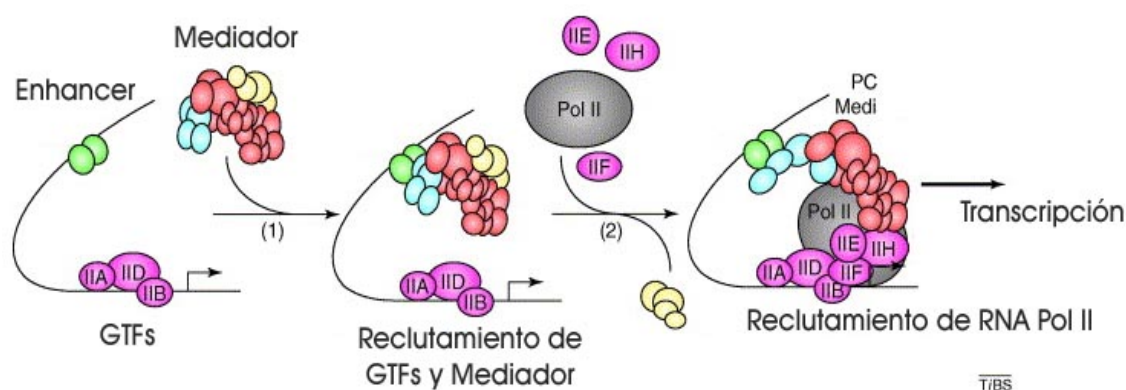


Figura 4. Maquinaria de transcripción. Se representa en un esquema la región del inicio del gen (línea negra). El promotor recluta la RNA polimerasa y factores generales de transcripción (GTFs, óvalos rosas). El complejo mediador (óvalos celestes, rojos y amarillos) actúa de puente entre los coactivadores que recluta el enhancer (óvalos verdes) y los GTFs. Esto permite a la RNA polimerasa II reconocer a la región promotora del gen e iniciar la transcripción. Imagen modificada a partir de la adquirida de la Revista Química de la Vida.

sensibilidad a diferentes inhibidores. La RNA polimerasa II, sintetiza los precursores de los RNAs mensajeros así como otros RNAs de pequeño tamaño. La actividad de la RNA polimerasa II se regula mediante la fosforilación de residuos de serina y treonina en el dominio carboxilo terminal (Kornberg 1998; Kornberg 1999).

Los promotores son las secuencias que definen el sitio de inicio de la transcripción. Para la mayoría de los genes transcritos por la RNA polimerasa II, la caja TATA se encuentra situada entre las posiciones -30 y -100 desde el punto de inicio de la transcripción. Numerosas proteínas identificadas como TF IIA, IIB, IIC, etc. interaccionan directa o indirectamente con la caja TATA. Estas proteínas son factores de regulación de la RNA polimerasa II. Aunque hay promotores que carecen de ella, en general, la caja TATA es necesaria, aunque no suficiente, para que exista una actividad transcripcional. Entre las posiciones -40 a -150 se encuentra situadas elementos adicionales como son las cajas CAAT, a la que se le une la proteína denominada C/EBP (CCAAT-box /enhancer/binding/protein) o cajas GC. En general, los genes de expresión constitutiva tienen en sus promotores cajas GC (Chen, Rao et al. 1999; Muller 2001; Muller 2001).

Además de los promotores, otras secuencias del DNA denominadas elementos reguladores o “enhancers” son las encargadas de llevar a cabo la regulación de la expresión génica. Estos elementos se pueden localizar en 5’ o en 3’, es decir, antes o después del inicio de

la transcripción del gen y a distancias del promotor que pueden alcanzar miles de pares de bases, En términos generales estas regiones del DNA regulan la actividad transcripcional a distintos niveles y para un mismo gen puede existir varias secuencias reguladoras con diferentes funciones. Es el conjunto todos los reguladores mas el promotor lo que define la actividad transcripcional del gen en cuestión. Existen reguladores tanto positivos, activadores, como negativos, silenciadores o amortiguadores de la transcripción (figura 4, círculos verdes) (Fiering, Whitelaw et al. 2000).

1.6 ESTUDIO DE PERFILES DE EXPRESIÓN POR MICROARRAYS

A finales de los años 80 el grupo de L. Stryer desarrolló una revolucionaria tecnología para la determinación y cuantificación de DNA en una muestra (Fodor, Read et al. 1991). Esta tecnología desembocaría posteriormente en la primera plataforma de microarrays de DNA, denominada entonces GeneChip de Affymetrix (Affymetrix). La principal ventaja de esta novedosa tecnología frente a los métodos tradicionales (Northern, Southern, etc.), residiría en la alta densidad de integración de material biológico que se consigue inmovilizar, es decir, la posibilidad de analizar simultáneamente miles de genes (Beier and Hoheisel 1999).

Un microarray de DNA consiste, basicamente, en un gran número de moléculas de DNA de copia única ordenadas sobre un sustrato sólido de manera que forman una matriz en dos dimensiones. Estos fragmentos de DNA pueden ser secuencias cortas llamadas oligonucleótidos, o de mayor tamaño, como cDNAs. En general, a estos fragmentos de DNA de copia única inmovilizados en el soporte, se les denomina “sondas”. El DNA que se utiliza en el microarray puede provenir de cualquier tipo de muestra (organismo completo, organo, tejido.....) o puede haber sido previamente sintetizado. Los ácidos nucleicos de las muestras a analizar se marcan por diversos métodos (enzimáticos, fluorescentes, etc.) y se incuban sobre el panel de sondas, permitiendo la hibridación de secuencias homólogas. Durante la hibridación, las muestras de material genético marcadas, se unirán a sus complementarias inmovilizadas en el soporte solido, permitiendo la posterior identificación y cuantificación del DNA presente en la muestra. Con posterioridad, un escáner y las herramientas informáticas adecuadas permiten interpretar y analizar los datos obtenidos (Sergey 1999).

El diseño de las sondas y sus producción con elementos claves a la hora de hacer posible la hibridación. Las sondas basadas en clones son fragmentos o genes completos, generalmente procedentes de librerías génicas. El tamaño de estas sondas varían entre algunos cientos de pares de bases hasta varios kilobases. Los productos de PCR son DNAs generados por este método a partir de clones de cDNA, librerías de genómicas, o mRNAs. Su longitud

suele ser de entre 200 y 500 pares de bases. Finalmente, las sondas consistentes en oligonucleótidos difieren de las anteriores en que el número de bases es más limitado, 20-25 para análisis de expresión diferencial y hasta 100 para análisis de expresión génica (Schena, Shalon et al. 1995).

La detección de la hibridación entre las sondas de DNA inmovilizadas en el soporte y los fragmentos de material genético de la muestra, requieren un marcaje previo de estas. En general, las muestras se marcan fluorescentemente con Cy3 y Cy5 (Osborn 2000). El uso de estos fluoróforos permite analizar varias muestras en el mismo “arrays”, eliminando la variabilidad que se produce cuando se comparan los resultados de la hibridación de diferentes ensayos, además de hacer posible el acceso a múltiples marcadores simultáneamente.

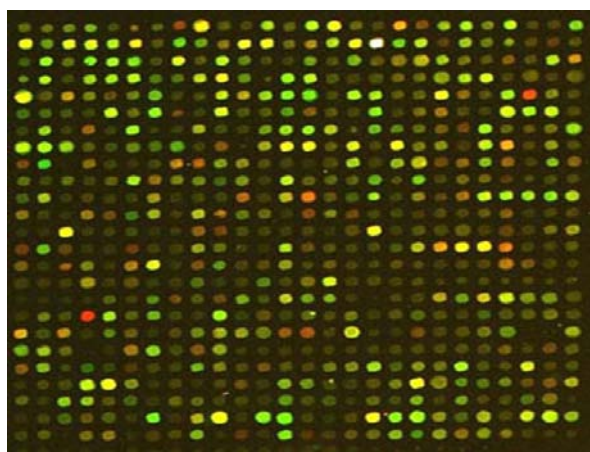


Figura 5. Microarrays de hibridación. Una parte representativa de un microarray muestra las señales diferenciales de dos muestras de RNA. Una de las muestras de RNA se transcribe en cDNA marcado con fluorocromo rojo, la otra muestra de RNA en cDNA marcado con fluorocromo verde, y la mezcla de cDNA se hibridó con manchas de DNA que representan diferentes genes. Hibridación selectiva de cDNA a partir de cualquiera de las muestras de RNA en un punto de DNA produce la señal de color rojo o verde, la hibridación del DNA de ambas muestras de RNA produce la señal amarilla. En este ejemplo, los puntos rojos representan RNA enriquecido en hermafroditas con líneas silvestres tipo de gérmenes, y los puntos verdes son RNA enriquecido en GLP-4 (BN2) mutantes con disminuido en gran medida las líneas germinales.

Una vez realizada la hibridación, los datos se recogen con un escáner que toma la fluorescencia emitida por los fragmentos de DNA que han hibridado con las sondas impresas en el array. Dependiendo del fluoróforo utilizado para el marcaje la emisión será Verde, Cy3 que emite a 510-550 nm, ó rojo, Cy5 cuya emisión esta entre 630 y 660 nm (Osborn 2000). En un experimento típico se obtienen dos imágenes, una para cada muestra, La cuantificación de la señal en cada punto del array de ambas permite comprar el nivel de hibridación de ambas muestras a cada sonda presente en el array (figura 5).

OBJETIVOS

Los resultados de los experimentos desarrollados en el área de la biología espacial tomando como modelo a *Drosophila melanogaster*, confirmaron que: 1) existe una aceleración del envejecimiento (Miquel and Fleming 1984); 2) se produce un desarrollo retardado en la etapa embrionaria (Marco, Gonzalez-Jurado et al. 1992) ; 3) la radiación cósmica existente en la órbita baja donde se está moviendo la Estación Espacial Internacional, no genera mutaciones en embriones, larvas ni pupas de *Drosophila melanogaster* (Marco, Gonzalez-Jurado et al. 1992; Benguria, Grande et al. 1996; Marco, Benguria et al. 1996); 4) la microgravedad altera poco el proceso de ovogénesis y de embriogénesis (Marco, Vernos et al. 1986; Vernos, Gonzalez-Jurado et al. 1989); 5) el sistema inmune en *Drosophila melanogaster* también se encuentra afectado (Marcu, Lera et al. 2011); 6) se producen cambios en el citoesqueleto y alteraciones morfológicas en las crestas de la mitocondria, indicando una función mitocondrial alterada (Marco, Benguria et al. 1996), en resumen se demostró que el desarrollo es lento pero normal y no solo en *Drosophila melanogaster* sino en mamíferos expuestos a microgravedad (Kojima, Sasaki et al. 2000). Para continuar en esta línea de investigación nos planteamos un estudio genético más profundo para analizar si y cómo cambian los perfiles de expresión de todos los genes de *Drosophila melanogaster* cuando se exponen a microgravedad. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron métodos bioinformáticos el MAS5 y R-AffyLIMGUI.

En este contexto, los objetivos de esta tesis Doctoral han sido:

1. Identificar genes *Drosophila melanogaster* que sufren cambios significativos en su expresión al estar sometido el animal a estrés producido por microgravedad real (ISS) y simulada (RPM), en el estadio de pupa, mediante estudios bioinformáticos.
2. Caracterización de los genes identificados mediante el método de correlación con el fin de encontrar si tenemos características comunes que los pudieran relacionar entre si desde un punto de vista funcional. ¿presentaban estos genes una co-regulación temporal?
 - i. Caracterización y estudio *in silico* de las regiones promotoras de estos genes.
 - ii. Análisis de los perfiles de expresión de estos genes durante el desarrollo embrionario mediante hibridación in situ y RT-PCR.
3. Validar los resultados bioinformáticos del objetivo 1 mediante la realización de nuevos experimentos de pupas expuestas a microgravedad simulada durante 4 días.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

Todos los reactivos empleados en la preparación de las distintas soluciones y tampones han sido de grado analítico o de grado apto para su uso en biología molecular.

3.1.1. Cultivo de *Drosophila melanogaster*

Las moscas se cultivaron en un medio compuesto de 10% de levadura, 7,5% de azúcar, 3,5% de harina de trigo, utilizando 0,6 % de ácido propiónico como antimicótico y 1,25% de agar.

De forma general en los estudios realizados en esta tesis las moscas se crecieron en una cámara de 25° C de temperatura y un 60% de humedad relativa, bajo un ciclo de 12 horas luz-12 horas oscuridad.

3.1.2. Líneas de *Drosophila melanogaster*

La línea de *Drosophila melanogaster* que se han usado en el desarrollo de esta tesis ha sido la cepa silvestre Oregon R. Para los estudios fenotípicos se utilizaron las siguientes líneas, todas obtenidas de “Bloomington Stock center”:

IMPL3 - Stock 16829 - $y^1 w^{67c23}$; P{EPgy2}EY07426

CG5326 - Stock 12694 - w^{1118} ; P{GT1}CG5326^{BG02475}

DNAJ-1 Stock 15379 - $y^1 w^{67c23}$; P{EPgy2}DnaJ-1^{EY04359}

CG14598 - Stock 17938 - w^{1118} ; PBac{RB}CG14598^{e01297}/TM6B, Tb

CG4726 - $y^1 w^{67c23}$; P{EPgy2}EY00370

3.1.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron diseñados con la ayuda del programa informático Vector NTI Advance 10 (Rozen and Skaletsky 2000) y fueron sintetizados por Sigma. En la Tabla I se especifica el nombre, la secuencia en dirección 5' a 3' y la aplicación para la que fueron diseñados.

TABLA I

Oligonucleotido	Secuencia	Aplicación
cg4726-3'	Cacaatggccatgccgatg	Perfil expresión
cg4726-5'	Ggcaatgcacgtggacttc	Perfil expresión
Dnaj-1-3'	Ggagtggcattaacagcttctac	Perfil expresión
Dnaj-1-5'	Cttgaaaatgcctaagggtctgtta	Perfil expresión
Impl3-3'	Tacgacttcgcgcgaccgg	Perfil expresión
Impl3-5'	Gccttcgagctgctggagtt	Perfil expresión
cg14598-5'	Aaattcaaagtgttcggtagc	Perfil expresión
cg14598-3'	Ttgaaaggcagatccactt	Perfil expresión
cg5326-5'	Cgacgcgtatgcgtgatattgcct	Perfil expresión
cg5326-3'	Ttgggtgcgcagatcctcgtgct	Perfil expresión
IMPl3 5'	Atggccgccattaaggacagtc	Obtención Ribosondas
IMPl3 3'	Ttagaacttcagaccagcctggacatc	Obtención Ribosondas
cg14598 5'	Atgtcactgaaatacttactcattgctgtgc	Obtención Ribosondas
cg14598 3'	Ctacagtctgacgaagcgtggaaaag	Obtención Ribosondas
Dnaj-1 5'	Atgggcaaagacttctacaagattctgggc	Obtención Ribosondas
Dnaj-1 3'	Ctagttgggcagcagctcggacagc	Obtención Ribosondas
cg5326 5'	Atgtcggtcagactgaacgagacga	Obtención Ribosondas
cg5326 3'	Ctactccttttcgcgcgcagc	Obtención Ribosondas
cg4726 5'	Atgacggacgaagtgccgc	Obtención Ribosondas
cg4726 3'	Ttagggcttagtggcagctccttc	Obtención Ribosondas
cg4726 5'Corte	Atgcacgtgatgatcgccctcc	Obtención Ribosondas
cg4726 3'Corte	Cccaacaagcagcgtttcatca	Obtención Ribosondas

Para los ensayos de PCR a tiempo real se utilizaron las siguientes sondas (Applied Biosystems):

TABLA II

Nombre del Gen	Exón	Longitud amplicón	Sonda
IMPL3	_03 _04	93	Dm01841229_g1
CG4726	_1 _2	64	Dm01800475_m1
CG14598	2	134	Dm02368409_s1
CG5326	_03 _04	81	Dm02143291_g1
Dnaj-1	1	101	Dm02362419_s1
18S		61	Mm03928999_g1

3.1.4. Cepas bacterianas

Para la transformación y crecimiento de plásmidos se utilizó la cepa de *E. coli DH5α*. El genotipo de esta cepa se han descrito previamente (Sambrook, Fritsh et al. 1989).

3.1.5. Plásmidos

Para todos los clonajes realizados en el transcurso de esta tesis se han utilizado los vectores pGEM-Teasy (Promega), pTOPO-TA (Invitrogen), pDrive (Qiagen). Los tres vectores estan específicamente diseñado para el clonaje de productos de PCR.

3.1.6. Hardware

3.1.6.1. Hardware:

El equipo de simulación de microgravedad utilizado fue la “Random Position Machine” (RPM) ubicada en ESTEC (Holanda).

El equipo utilizado para la PCR cuantitativa fue *7900 Fast Real-Time PCR System*.

El procesamiento de los datos se llevó a cabo en un procesador Intel ® Core TM2 Quad CPU Q6600 @ 2.4 GHz, con una memoria instalada de 8.0 GB, memoria RAM de 512 MB con un sistema operativo de 64 bits.

Los algoritmos estadísticos que se utilizan para el análisis de expresión génica fueron el MAS (Microarray Analysis Suite) 5.0 (www.affymetrix.com) y el affymGUI RMA (Robust Multiarray Averaging) (Irizarry, Hobbs et al. 2003; Wettenhall and Smyth 2004; Smyth, Gentleman et al. 2005), este último trabaja en plataforma R. Ambos algoritmos han sido desarrollados por la compañía affymetrix (www.affymetrix.com). Para la unificación de los métodos se utilizó Qbase dentro de la plataforma Office.

3.2. MÉTODOS

Los métodos generales de biología molecular, como el clonaje del DNA en plásmidos, la transformación de *E. coli*, la realización de cultivos bacterianos y las técnicas electroforéticas de proteínas y ácidos nucleicos se llevaron a cabo según protocolos estándar que han sido previamente descritos (Sambrook and Russell 2001).

3.2.1. Método de Correlación

Este método consiste en comparar dos métodos más populares que se utilizan para analizar chips de microarrays, el MAS5 de Affymetrix y el RMA del Bioconductor, con un nuevo método de correlación que proviene de la fusión de ambos. Este método llamado método de procesos estocásticos calcula los diferentes valores de correlación para diferentes valores de Cut_Off como P_Value, del conjunto de genes estadísticamente diferenciables, utilizándolos como variables determinantes en la obtención de los resultados. El método no condiciona los resultados con un determinado valor de Cut_Off ó P_value, el método encuentra un valor de corte para los P_value de 0.045. Este método no sólo compara afinidad de dos grupos de datos al medir el respectivo coeficiente de correlación como lo hacen los métodos tradicionales, también nos da información sobre grupos de genes para un determinado intervalo y valor específico de correlación $\left(\frac{n-1}{11}\right) < R^2 < \left(\frac{n}{10}\right)$ para todo $n \in \mathbb{N}$ menores que 11.

Se han utilizado dos variables dinámicas, la primera de ellas corresponde a los valores de expresión seleccionados tras la aplicación de los filtros con el programa MAS 5.0 y la otra variable utilizada corresponde a los valores normalizados con el P-value según BH obtenidos tras el análisis de los datos con el programa R-AffymGUI. Con estas dos variables dinámicas se buscó un algoritmo que calculara las correlaciones correspondientes a las señales fluorescentes emitidas por la expresión de un grupo de mRNAs en los microarrays. Para obtener el algoritmo, se fijó primero el valor del P-value procedente del programa R-AffymGUI y sobre este valor se hizo variar los valores del Cut_off con pasos de 0.001 y 0,01 respectivamente. Por cada paso que realiza el algoritmo se calcula el nº de genes que se expresan en microgravedad real y microgravedad simulada y la correspondiente correlación. A continuación el programa ordena estos grupos de datos según el valor de correlación con paso de 0,1 y se obtienen 10 valores (vectores).

3.2.2. Análisis de Microarrays

Los algoritmos estadísticos que se utilizan para el análisis de expresión génica fueron el MAS (Microarray Analysis Suite) 5.0 (www.affymetrix.com) y el affymGUI RMA (Robust

Multiarray Averaging) (Irizarry, Hobbs et al. 2003; Wettenhall and Smyth 2004; Smyth, Gentleman et al. 2005), este último trabaja en plataforma R. Ambos algoritmos han sido desarrollados por la compañía affymetrix (www.affymetrix.com). Para la unificación de los métodos se utilizó Qbase dentro de la plataforma Office.

3.2.3. Análisis de Secuencias

Todas las secuencias utilizadas a lo largo de este trabajo se obtuvieron de las bases de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y ENSEMBL (www.ensembl.org)

El análisis de las posibles zonas reguladoras, realizo utilizando el servidor “Genome Browser” University of California Santa Cruz (www.genome.ucsc.edu). Este servidor contiene multitud de alineamientos pre-computados entre genomas de un gran número de organismos, entre ellos 12 especies de *Drosophila*.

La búsqueda de posibles sitios de unión para factores de transcripción en las regiones conservadas identificadas se realizo utilizando la base de datos TFSARCH (<http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html>). En el análisis de la posible implicación de los factores de transcripción identificados en una función biológica común se ha utilizado la base de datos David Bioinformatic (david.abcc.ncifcrf.gov).

Los análisis de secuencia no realizados “on line”, como comparaciones entre dos especies de *Drosophila*, identificación de intrones o definición precisa de regiones conservadas se realizo con el programa Vector NTI® Advance (Invitrogene). Este programa se ha utilizado como programa de apoyo para el diseño de oligonucleótidos, diseño de construcciones y otras técnicas habitualmente utilizadas en biología molecular.

3.2.4. RT-PCR y qRT-PCR

En general, el RNA de las muestras fue extraído y cuantificado según protocolos estándar utilizando Trizol (Trizol Reagent de Invitrogen). El RNA purificado fue resuspendido en 20,0 ml de agua libre de RNAsa y conservado a -20 °C. Para cada reacción de RT se retrotranscribio 1µg de RNA utilizando el kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.5. RT-PCR

Los ensayos de PCR convencional se realizaron utilizando un aparato Gene Amp PCR System 2700 de Applied Biosystems y el enzima utilizado fue Dynazyme II (Fermentas). Los ensayos se realizaron a 25 ciclos, con una temperatura de anillamiento de entre 55,0 y 62,0 °C,

según la pareja de cebadores utilizada. El tiempo de desnaturalización, anillamiento y extensión fue de 30s y en un volumen total de 25,0 mL por muestra.

3.2.6. qRT-PCR

La cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real se realizó en un equipo 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem). La cuantificación se realizó utilizando sondas Taqman marcadas con FAM para los genes en estudio, diseñadas por Applied Biosystems (ver tabla 2) y VIC para el control endógeno. Las condiciones de la reacción de amplificación fueron establecidas por el Servicio de Secuenciación y PCR en tiempo Real del instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM. En todos los casos se analizaron por triplicado y en al menos 3 experimentos independientes.

El parámetro crítico de la RT-PCR es el ciclo umbral Ct (threshold cycle) que define el momento de la reacción de PCR en el que se genera una señal de fluorescencia significativa. El Ct es inversamente proporcional al número de copias de DNA original. Para cada muestra se calcula el ΔCt restando al $Ct_{muestra}$ el Ct control (Ct_{iss}). Posteriormente se calcula el $\Delta\Delta Ct$ según la fórmula $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{muestra} - \Delta Ct_{control}$. Finalmente se calcula la proporción de mRNA del control

frente al del gen en estudio: $\left(\frac{mRNA_{muestra}}{mRNA_{control}} \right) = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001)

3.2.7. Marcaje de Sondas de RNA

El marcaje de ribosondas con digoxigenina se realizó siguiendo protocolos standard (Owens, Hess et al. 2006). Brevemente, se linealizó un mg de plásmido mediante digestión con el enzima de restricción apropiado. A continuación se transcribió la sonda con la RNA polimerasa apropiada en presencia UTP-dig (Roche). Según el caso se han utilizado las polimerasas T7, SP6 (Invitrogen) o T3 (Roche). A continuación las sondas fueron fragmentadas por tratamiento con carbonato a 50°C, precipitadas con etanol y re-suspendidas en tampón de hibridación (ver mas abajo). En todos los casos se marcaron las dos cadenas, sentido y anti-sentido, para poder descartar la señal inespecífica. La “sonda sentido” no debería producir señal alguna.

3.2.8. Métodos de *Drosophila*

Los métodos generales de mantenimiento y manipulación de *Drosophila* se llevaron a cabo según protocolos estándar que han sido previamente descritos (Sullivan and Ashburner 2000). A continuación se describen brevemente los métodos específicos más relevantes utilizados en el desarrollo de esta tesis.

3.2.9. Recogida y fijación de embriones

Los embriones fueron recogidos sobre mosto/agar al 3,5% y pH 5 en placas de 3,5 cm (Sterilin Limited, UK.) durante el tiempo requerido en cada experimento. Los embriones se recogieron mediante procedimientos estándar, se lavaron abundantemente con agua destilada, se decorionizaron con lejía diluida al 50% durante 2,5 minutos y se volvieron a lavar abundantemente. A continuación, se fijaron los embriones durante 20,0 minutos en agitación fuerte en viales de centelleo con 6,0 mL de heptano y 1,0 ml de fijador (4% PFA, 50 mM EDTA en PBS). Se sustituyó el fijador por 8 metanol y se agitó vigorosamente durante 30s para retirar la membrana vitelina. Los embriones se lavaron repetidamente con metanol para retirar el heptano y se guardaron a -20°C hasta su utilización.

3.2.10. Hibridación *In-Situ*

Para la determinación del patrón de expresión embrionario de cada uno de los genes en estudio, las hibridaciones *in situ* se realizaron siguiendo protocolos standard con modificaciones menores. (Davies, Hodge et al. 1996). Brevemente, los embriones se rehidrataron y fijaron de nuevo en 4% Formaldehído en PBS. A continuación los embriones fueron tratados brevemente con proteinasa K (Invitrogene) y fijados de nuevo. Se equilibraron los embriones en tampón de pre-hibridación (5X SSC, 50% formamida) a 55°C. Los embriones se bloquearon durante 30 min a 55°C en tampón de hibridación (5X SSC, 50% formamida, 7% tRNA de levadura (Sigma)) e incubados toda la noche con 1ml de sonda diluida en 30 ml de tampón de hibridación a la misma temperatura. Tras lavar abundantemente se incubaron los embriones 1 h con un anticuerpo anti-Dig marcado con fosfatasa alcalina (Roche) diluido 1/2000 y previamente pre-absorbido a embriones silvestres de menos de 2h de edad. Se reveló bajo la lupa, tras lavar repetidamente, con NBT - BCIP (Roche) hasta que se desarrolló la señal específica. Posteriormente los embriones fueron deshidratados con Etanol, montados en Canadá Balsam (Sigma) y fotografiados.

RESULTADOS

Históricamente, uno de los principales objetivos de las investigaciones realizadas en el campo de la Biología Espacial ha sido estudiar el comportamiento de los sistemas biológicos en el espacio. En este contexto, el objetivo general de esta tesis ha sido conocer, identificar y caracterizar los genes implicados en la respuesta a los cambios de gravedad mediante microarrays, de los experimentos realizados durante la misión Cervantes (2003). El experimento GENE, dentro del Programa experimental de la misión Cervantes, permitió recoger distintas muestras de pupas que se habían desarrollado durante 3,5 días en el módulo experimental de la Estación Espacial Internacional (International Space Station (ISS) en ausencia de gravedad. Como continuación de esta línea de investigación nos planteamos un estudio más profundo. Así, se han analizado cómo cambian los perfiles de expresión en *Drosophila melanogaster* cuando este organismo se expone a microgravedad. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron dos aproximaciones bioinformáticas el MAS5.0 de Affimetrix y el paquete affyGUI R de Bioconductor (Gentleman, Carey et al. 2004).

En el experimento GENE se expusieron varios grupos de pupas tempranas a microgravedad durante 3 días y medio en la estación espacial internacional (ISS). Paralelamente, los mismos experimentos fueron realizados en tierra en condiciones de gravedad normal y microgravedad simulada. Estos experimentos se realizaron en los simuladores de microgravedad en tierra (RPM) ubicados en las instalaciones de la Agencia Espacial Europea (ESA, Holanda). Posteriormente, ya en tierra, se obtuvo el mRNA de las muestras y se analizaron los perfiles de expresión génica mediante ensayos de microarrays. Cada uno de estos chips permitía el análisis de 14.010 genes de *Drosophila*. Estos datos fueron pre-analizados con anterioridad al comienzo de esta tesis (Herranz, Benguria et al. 2010).

4.1.1. Análisis de datos según el programa MAS 5.0

Inicialmente, los datos de expresión génica obtenidos en los microarrays a partir de las muestras de pupas sometidas a microgravedad en la Estación Espacial Internacional se compararon con los datos equivalentes obtenidos a partir de pupas expuestas en tierra a microgravedad simulada (RPM). Ambos grupos fueron normalizados respecto a sus respectivos controles en tierra a gravedad normal. La correlación entre ambos grupos de datos fue de 0.554. Este resultado muestra, en primera aproximación, una tendencia lineal de expresión de mRNA entre las muestras expuestas a microgravedad en la ISS frente a la RPM (figura 6).

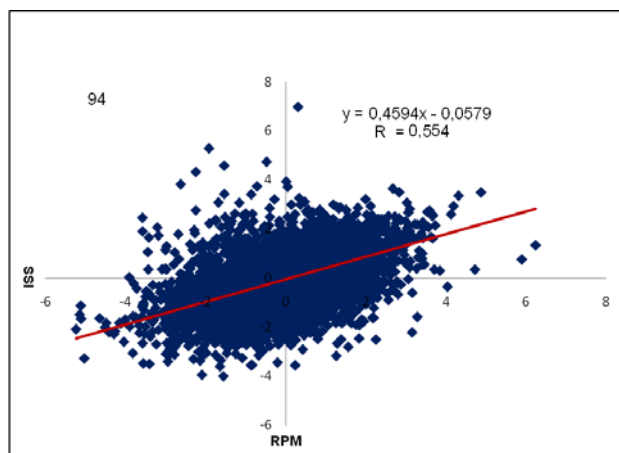


Figura 6. Correlación a escala genómica de los cambios de expresión en microarray. Perfil de expresión de los 14.010 genes expuestos a microgravedad. En el eje x se muestran los perfiles de expresión de pupas expuestas a microgravedad simulada, RPM. En el eje y se muestran los perfiles de expresión de pupas expuestas a microgravedad, ISS. (SLR - Signal Log₂ Ratios).

A continuación, se procedió a aplicar un primer filtro, que permitía la eliminación de todos aquellos genes que tenían mucha variabilidad entre replicas, tanto en el grupo control como en el grupo experimental (RPM ó ISS). Se eliminaron aquellos genes con un P-value entre replicas mayor de 0.5. Así, se eliminaron 7678 genes que se consideraron genes ruidosos. Al realizar un nuevo análisis de correlación con los 6332 genes restantes se observó un aumento de P-value a 0.795. Este conjunto de genes se agrupa de la siguiente manera (figura 7): [a] 2097 genes que aumentan su expresión tanto en la ISS como en la RPM (primer cuadrante), [b] 450 genes presentan regulación inversa en la ISS frente al RPM. Así en la RPM incrementan su expresión mientras esta se ve reducida en microgravedad real (segundo cuadrante, figura 7). [c] Los 3378 genes situados en el tercer cuadrante disminuyen sus niveles de expresión tanto en la ISS como en la RPM. [d] Los 407 genes restantes, aumentan su expresión en la ISS pero se reprimen en la RPM.

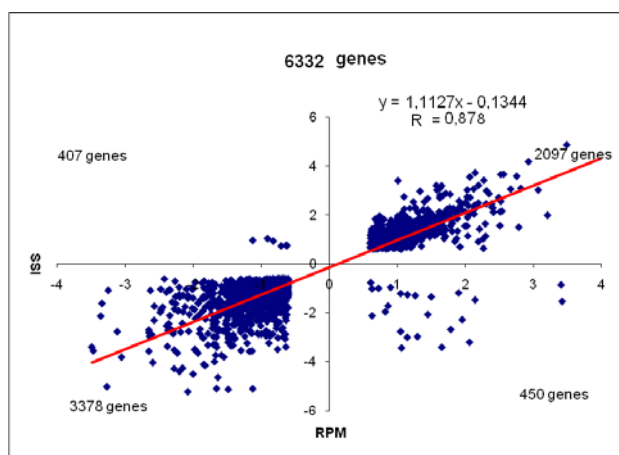


Figura 7. Correlación a escala genómica de los cambios de expresión en microarray tras la aplicación del primer filtro. En el eje x se muestran los perfiles de expresión de pupas expuestas a microgravedad simulada, RPM. En el eje y se muestran los perfiles de expresión de pupas expuestas a microgravedad, ISS. (SLR - Signal Log₂ Ratios).

El siguiente paso, fue analizar el cociente de variación en los 6332 genes que pasaron el primer filtro seleccionando solo aquellos genes que muestran una variación en su expresión mayor o igual a 2 veces frente al control de tierra. Se identificaron 807 genes que cumplen esta condición tanto en la ISS como en la RPM, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.912. Este conjunto de genes se agrupa de la siguiente manera (figura 8): [a] 338 genes que aumentan su expresión tanto en la ISS como en la RPM (primer cuadrante, figura 8), [b] 6 genes incrementan su expresión en la microgravedad simulada mientras esta se ve reducida en la ISS (segundo cuadrante, figura 8). [c] Los 462 genes situados en el tercer cuadrante disminuyen sus niveles de expresión tanto en la ISS como en la RPM. [d] No se detectó ningún gen cuya expresión aumente en la RPM y se reprima en la ISS (figura 8).

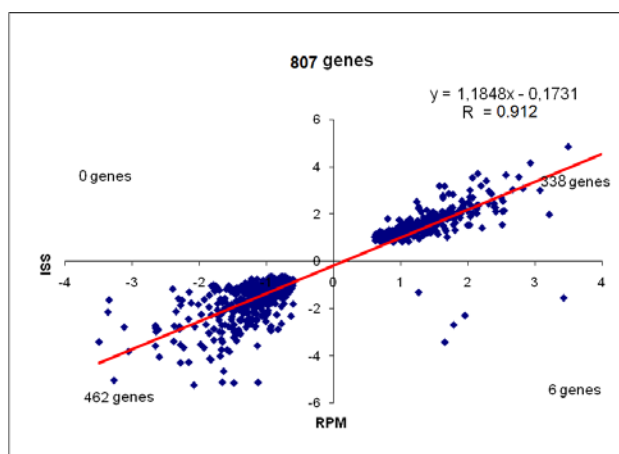


Figura 8. Correlación a escala genómica de los cambios de expresión en microarray tras la aplicación del segundo filtro (807). En el eje *x* se muestran los perfiles de expresión de pupas expuestas a microgravedad simulada, RPM. En el eje *y* se muestran los perfiles de expresión de pupas expuestas a microgravedad, ISS. (SLR - Signal Log₂ Ratios).

4.1.2. Análisis de datos según el programa informático R-AffymGUI

En paralelo, se realizó un análisis sobre los mismos datos utilizando el programa R-AffymGUI (Smyth, GK 2005), siguiendo el protocolo “*Robust Multiarray Averaging*” (Irizarry, Hobbs et al. 2003) y normalizando respecto a los controles en tierra. El cálculo del *P-Value* se realizó según el algoritmo “*Benjamini and Hochberg*” (Benjamini and Hochberg 1995). Al comparar los datos obtenidos a partir de las muestras sometidas a microgravedad real en la ISS y a microgravedad simulada en la RPM se obtuvieron, utilizando unos valores de *P-value* < 0.05 y *Cut-Off* > 0.5, 722 genes estadísticamente diferenciables, con una correlación de 0.954 (figura 9).

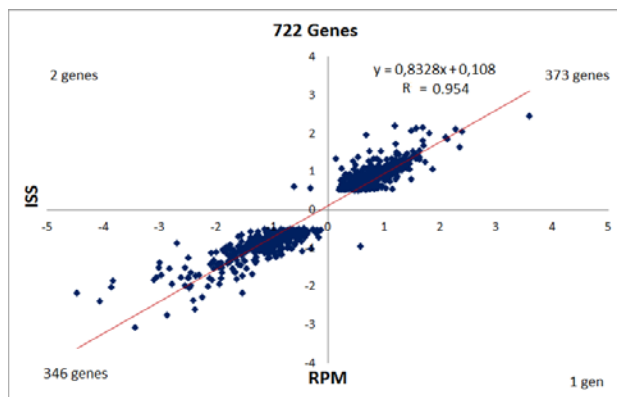


Figura 9. Correlación a escala genómica de los cambios de expresión en microarray según el análisis con el software AffymGUI. En el eje y se muestran los perfiles de expresión de pupas expuestas a microgravedad, ISS. En el eje x se muestran los perfiles de expresión de pupas expuestas a microgravedad simulada, RPM. (SLR - Signal Log₂ Ratios).

4.1.3. Comparación entre los algoritmos MAS 5.0 y R-AffymGUI

La comparación de los datos obtenidos mediante los programas MAS5.0 y el R-AffymGUI, mostraba que ambos grupos de datos tenían un coeficiente de correlación diferente. Esto nos hizo suponer que los genes identificados por cada programa no eran necesariamente los mismos. Por tanto se decidió analizar los datos obtenidos a partir de los experimentos realizados en la ISS y en la RPM por separado. Así, se compararon entre si todos los datos obtenidos con ambos programas, MAS 5.0 y R-AffymGUI, para cada uno de los grupos experimentales (ISS y RPM). Como se observa en las figuras 10 (ISS) y 11 (RPM), esta comparación reveló la existencia de dos grupos de genes. El primero de ellos corresponde a aquellos genes cuya variación de expresión en respuesta a la microgravedad es detectada por ambos programas en la misma dirección. Es decir, ambos programas revelan el mismo tipo de respuesta, incremento o reducción de su expresión en respuesta a microgravedad, para estos genes. El segundo grupo de genes se distribuye a lo largo del eje indicando que solo el programa MAS 5.0 detecta variaciones significativas en sus niveles de expresión. Es importante destacar que el análisis de los datos obtenidos a partir de las muestras sometidas a microgravedad simulada muestra una mayor dispersión.

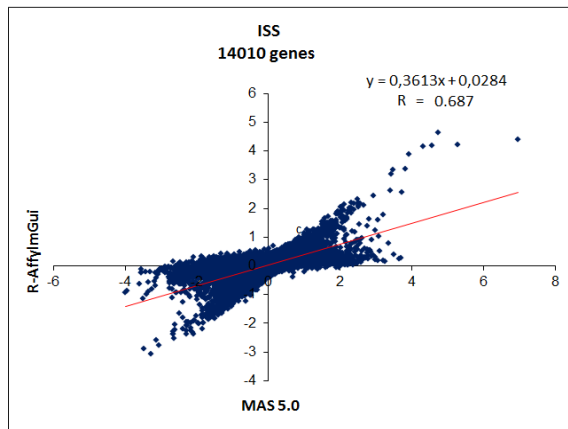


Figura 10. Comparación de los datos obtenidos para el grupo experimental ISS analizados según el programa MAS 5.0 en el eje x , frente a los obtenidos en el análisis con el software R-AffymGUI, eje y .

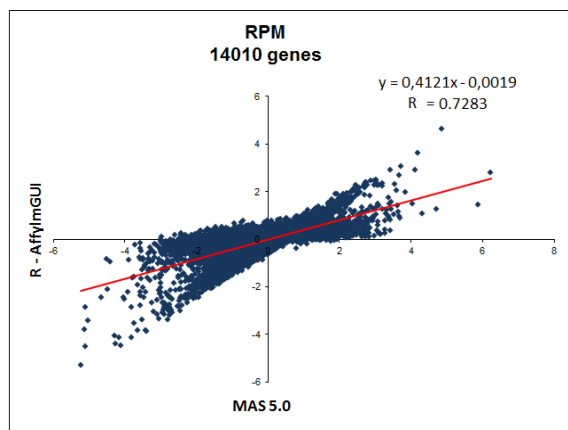


Figura 11. Comparación de los datos obtenidos para el grupo experimental RPM analizados según el programa MAS 5.0 en el eje x , frente a los obtenidos en el análisis con el software R-AffymGUI, eje y .

Con objeto de descartar los genes presentes en esta segunda población, a los que se considera genes “ruidosos”, se establecieron unos criterios de selección mas estrictos: un P -value < 0.05 y un $cut-off > 0.76$ (figuras 12 y 13).

Tras someter los datos del grupo experimental ISS a este segundo filtro, 1035 genes cumplían la condición impuesta según el algoritmo MAS 5.0 y 929 siguen el R-AffymGUI. Un total de 702 genes solapaban en ambos métodos (figura 12). Estos 702 genes muestran una correlación de 0.976.

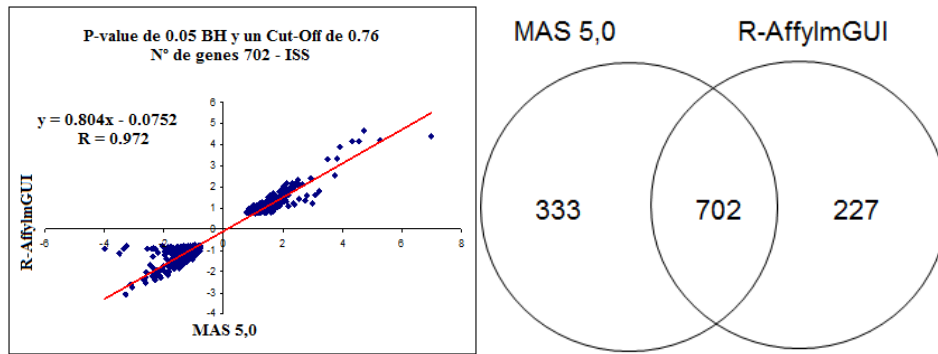


Figura 12. A) Comparación de los datos obtenidos para el grupo experimental ISS con $P\text{-value} < 0.05$ y $Cut\text{-off} > 0.76$ analizados según el programa MAS 5.0, eje x , frente a los obtenidos en el análisis con el software R-AffymGUI, eje y . **B)** Diagrama de Venn, indicando el conjunto de genes comunes.

Igualmente, se sometieron los datos del grupo experimental RPM a este segundo filtro. 1318 genes cumplían la condición impuesta según el algoritmo MAS 5.0 y 691 siguen el R-AffymGUI. Un total de 500 genes solapaban en ambos métodos (figura 13). Estos 500 genes muestran una correlación de 0.957.

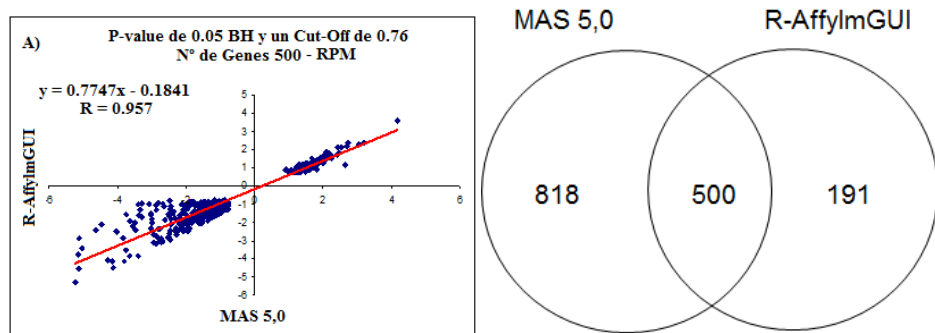


Figura 13. A) Comparación de los datos obtenidos para el grupo experimental RPM con $P\text{-value} < 0.05$ y $Cut\text{-off} > 0.76$ analizados según el programa MAS 5.0, eje x , frente a los obtenidos en el análisis con el software R-AffymGUI, eje y . **B)** Diagrama de Venn, indicando el conjunto de genes comunes.

4. 1.4. Análisis de datos mediante el método de correlación

Finalmente, se trató de llevar a cabo un estudio que permitiera unificar el análisis de datos según el MAS5.0 con el realizado mediante el algoritmo R-AffymGUI. Este proceso se denominó método de correlación. El programa aceptó valores $P\text{-value}$, según el algoritmo “Benjamini and Hochberg” (Benjamini and Hochberg 1995), menores a 0,05 que corresponden a un $cut\text{-off}$ entre 0.01 a 2.5.

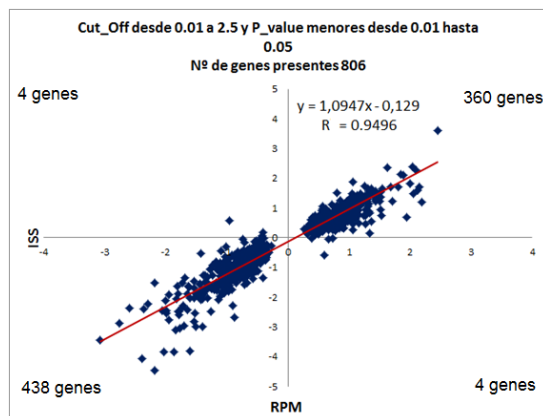


Figura 14. Análisis de datos mediante el método de correlación. El eje indica todos los genes que fueron expuestos en la RPM. El eje y indica todos los genes que fueron expuestos en la ISS.

La figura 14, muestra una correlación de 0.952 del grupo de genes expuestos en la ISS respecto al simulador RPM, ambos normalizados respecto a sus controles en tierra. Se obtuvieron 806 genes comúnmente estadísticamente diferenciables. 804 genes se mueven en la misma dirección, mientras que 2 tienen direcciones contrarias. Otro resultado importante fue encontrar una matriz, cuyos elementos representaban la correlación de un conjunto de datos para valores variables tanto para P_value como para Cut-off (figura 15). El valor de P_value que encontró el programa fue de 0.045. Se observaron tres poblaciones, la primera de ellas se encuentra comprendida entre 2.17 a 2.5 cut-off obteniendo grupos de correlación desde -0.6 a 1, el segundo grupo se encuentra comprendido entre 1.63 a 1.27 de cut-off los mismos que fueron agrupados de acuerdo al grado de correlación desde 0.4 a 1, por último se observa una pequeña población comprendida desde 0.82 a 1 cut_off cuyos valores de correlación son mayores e iguales a 0.8 (figura 15). Como aparecieron tres poblaciones de genes, se pensó que posiblemente habría genes comunes entre las tres poblaciones, o genes comunes entre diferentes grupos de correlación. Por ello se procedió a agruparlos según el grado de correlación que hay entre el conjunto de genes que los forman. Utilizando la información presentada en el anexo A, B y C, se formó el cluster de correlación (figura 16), donde se observan seis genes que pertenecen a otros grupos de correlación. Dichos genes los hemos llamado genes solapantes. Se podrá observar en la tabla III que los seis genes responden disminuyendo su expresión por falta de gravedad.

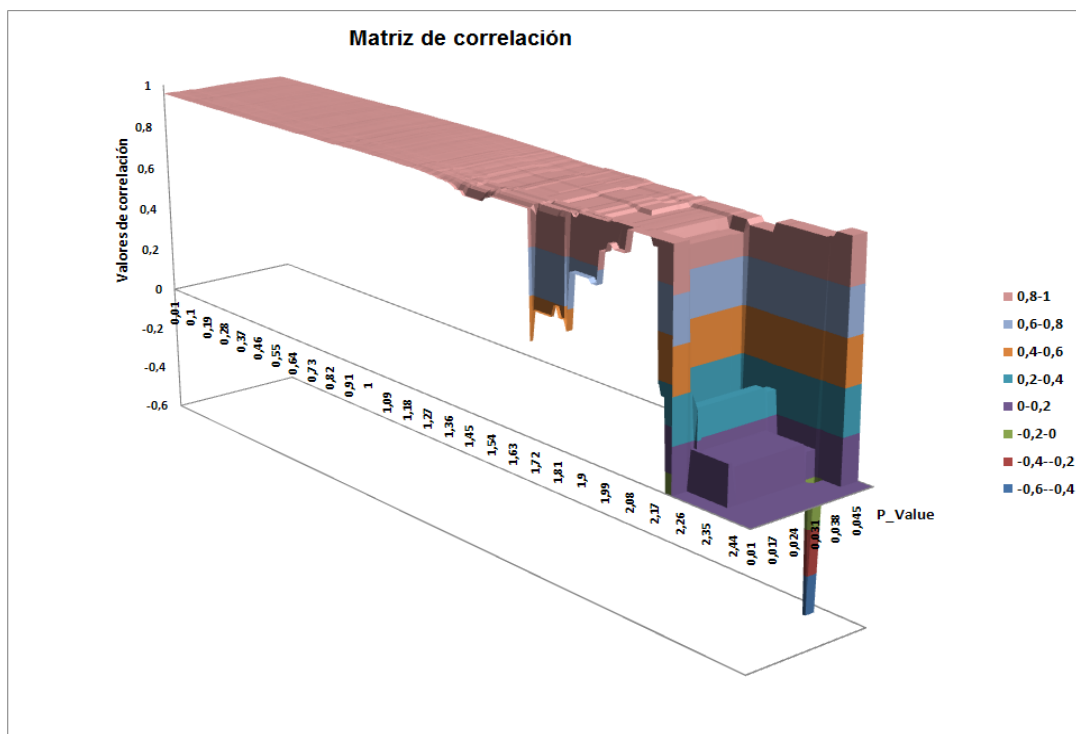


Figura 15. Elementos de matriz variando los P-value y los cut-off. Eje z: valores de correlación, eje y: P_value, x: cut-off.

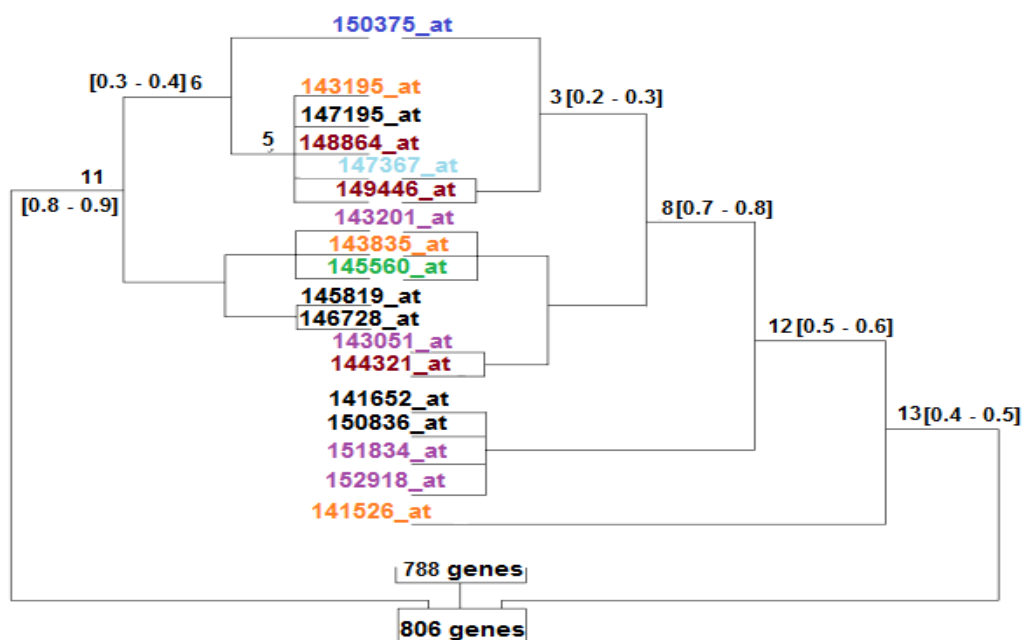


Figura 16. Cluster de correlación. El color indica los genes que participan en funciones biológicas comunes. Información extraída de la base de datos de David Bioinformatic. Se observa que los genes solapantes están representados por colores distintos. Esta información indica, que hasta el día de hoy no se ha publicado ningún trabajo donde confirmen que los genes solapantes tengan una relación funcional.

Probe Set ID	Gene Symbol	Signal log Ration ISS	Signal log Ration RPM
143201_at	Impl3	-2,00147	-2,123636
143835_at	Dnaj-1	-1,98596	-2,438997898
145560_at	CG4726	-2,05288	-2,463829429
147367_at	CG18431	-3,07417	-3,435718392
149446_at	CG14598	-2,36841	-3,435718392
150375_at	CG5326	-2,29667	-2,22531976

Tabla III. Lista de genes solapantes.

El último paso del algoritmo es calcular el número de veces que un gen aparece por cada una de las 10750 iteraciones. Para poder tener valores comparativos, se optó a calcular la frecuencia respecto al 100% de las 10750 iteraciones, por cada uno de los genes. Se observó (figura 17) que los seis genes solapantes aparecen en más del 85% de las 10750 iteraciones.

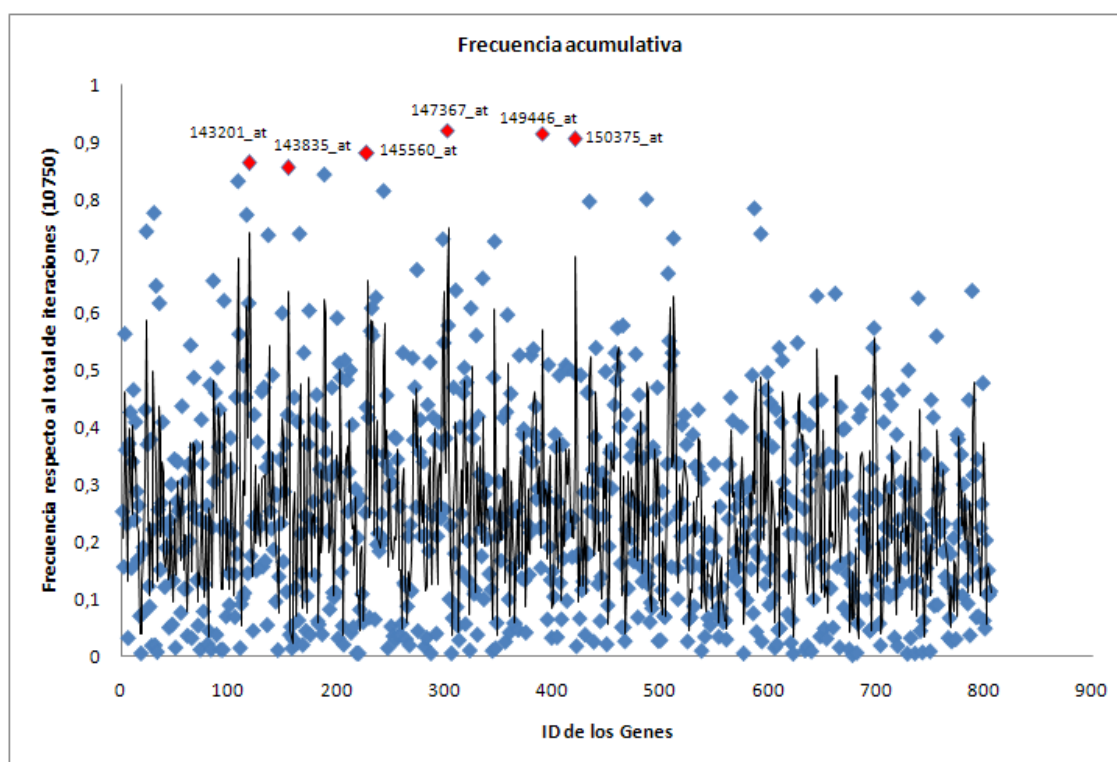


Figura 17. Frecuencia acumulada por cada una de las 10750 iteraciones. x : identificador del ID de cada uno de los genes. y : porcentaje de la frecuencia respecto a las 10750 iteraciones.

4.2. ESTUDIO DE LOS SEIS GENES SOLAPANTES

El siguiente objetivo de este trabajo fue tratar de caracterizar los 6 genes identificados mediante el método de correlación con el fin de encontrar características comunes que los pudieran relacionar entre si desde un punto de vista funcional. El primer paso en esta caracterización fue el estudio *in silico* de las regiones promotoras de estos genes. Se han analizado las secuencias correspondientes a las regiones 5' del inicio de transcripción y al intrón 1 de distintas *Drosophilidae* para ver si su regulación está coordinada. Un grupo importante de genes en *Drosophila* presentan elementos reguladores en el intrón (Padgett, St Johnston et al. 1987; Mas, Garcia-Zaragoza et al. 2004). Para ello se han utilizado dos estrategias complementarias: a) La primera ha sido la utilización del programa Vector NTI para poder comparar las regiones seleccionadas, zona 5' del inicio de transcripción y el intrón 1, en tres especies de *Drosophila*: *melanogaster*, *pseudoobscura* y *virilis*. Las tres *Drosophilidae* se encuentran evolutivamente separadas entre sí 15 millones de años. *D. melanogaster* presenta un genoma de menor tamaño que las otras dos especies. Siendo el tamaño total de su genoma. b) Se ha realizado un estudio de la misma naturaleza utilizando la base de datos <http://genome.ucsc.edu/> que compara las 12 especies de *Drosophila*.

Las figuras 18 - 23 muestran esquemas de las comparaciones de secuencia entre *D.melanogaster*, *D. pseudoobscura* y *D. virilis*. Las regiones evolutivamente conservadas entre las tres especies se representan como cajas marrones. En las figuras no se ha destacado la región conservada en las proximidades del inicio de la transcripción, y solo se representan las regiones situadas a más de 200 pb. Estas regiones se consideran posibles secuencias reguladoras de la transcripción dada su elevada conservación evolutiva. Cabe destacar que salvo en el caso del gen DnaJ se encontraron varias regiones conservadas tanto en la regiones 5' como en el primer intrón.

Así, en el gen IMPL3 se encontraron 5 regiones conservadas, 2 en la región 5' promotora y 3 en el primer intrón, de entre 121 y 344 pb y un porcentaje de conservación que varía entre el 50 y el 70% (figura 18).

En el gen CG4726 únicamente aparece dos regiones conservadas en la zona 5' promotora, de 230 y 150 pb respectivamente, y muy próximas entre si. Ambas están situadas a mas de 1300 pb del inicio de la transcripción. Es interesante observar que en el ortólogo de *D. pseudoobscura*, GA18388, ambas regiones están conservadas no solo en cuanto a su secuencia sino también en su organización, mientras que en el ortólogo GJ1952 de *D. virilis* esta región aparece reorganizada (figura 19). Por el contrario, en la secuencia del intrón 1 aparece una

organización muy similar entre especies, apareciendo tres regiones conservadas de tamaño similar en las tres (figura 19).

En la figura 20, se muestran las regiones conservadas par el gen CG14598. En el momento de realizar estas comparaciones, el gen ortólogo en *D. virilis* no estaba secuenciado, observándose una elevada conservación entre los ortólogos de *D.melanogaster* y *D. pseudoobscura*. Así, en la región 5' del gen aparecen 2 regiones conservadas de gran tamaño, 728 y 948 pb respectivamente, y porcentaje de conservación de mayor del 50%. En contraste, en la región intrónica, aparecen dos regiones de pequeño tamaño, 168 y 67 pb, y un nivel de conservación algo mayor que en la región 5' (figura 20)

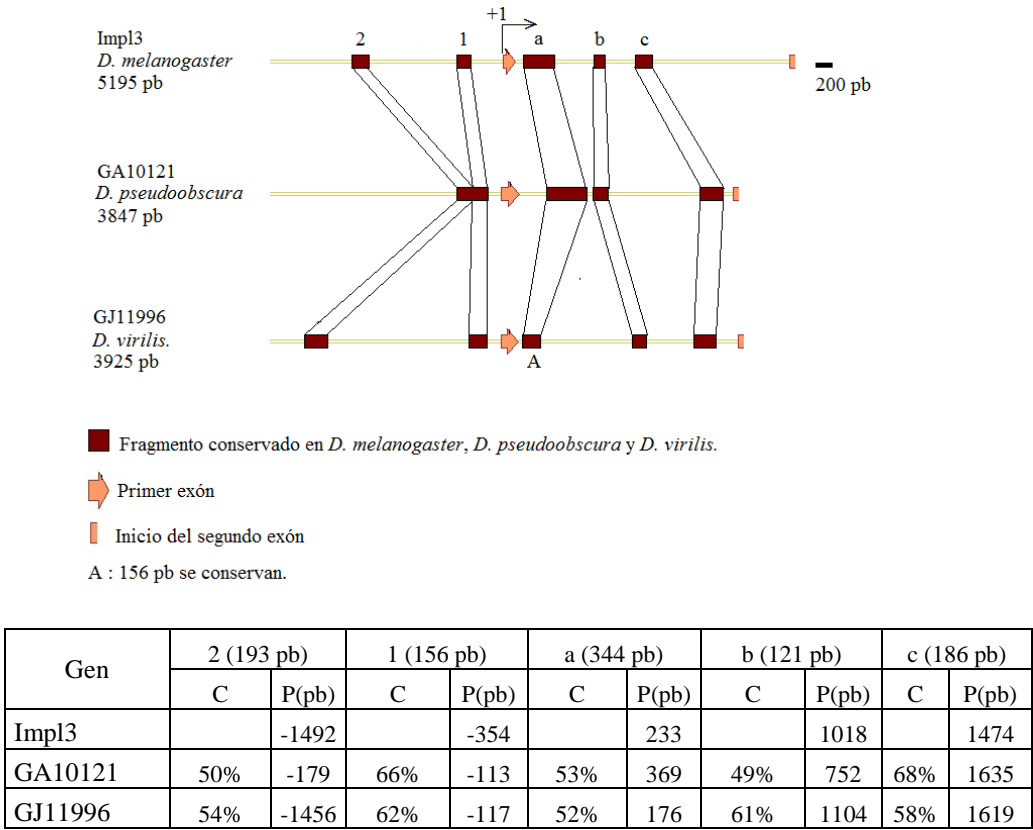
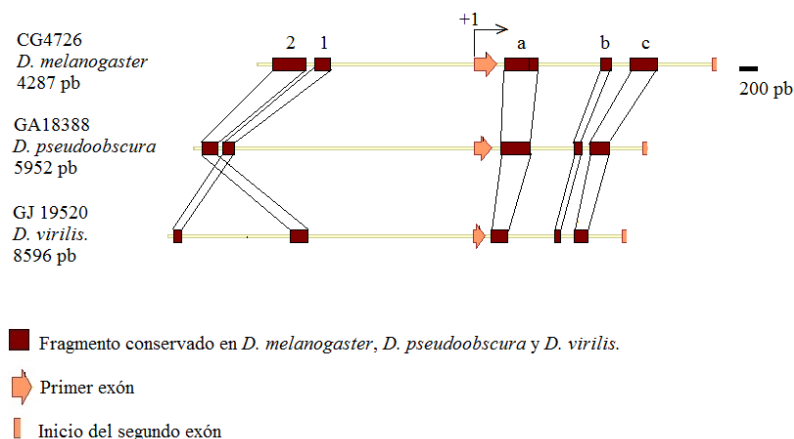
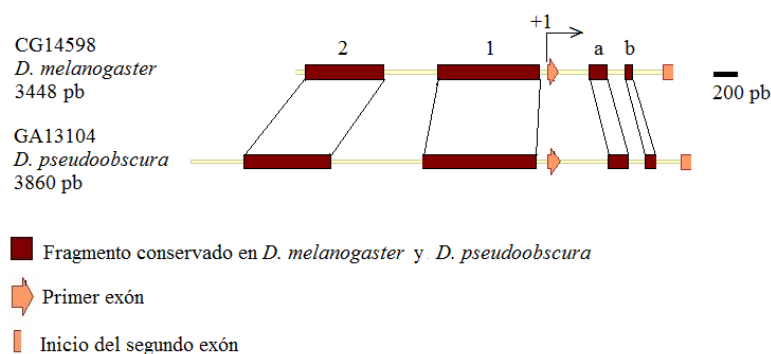


Figura 18. Conservación genómica en el gen IMPL3 de *Drosophila melanogaster*. A.- Se muestran las regiones genómicas, la zona 5' y primer intrón, conservadas entre *D. melanogaster*, *pseudoobscura* y *virilis* (cajas de color marrón). El primer exón y el principio del segundo se marca en naranja. La posición del inicio de la transcripción (+1) esta indicada con una flecha. B.- se presenta una tabla indicando, en la parte superior, el tamaño de cada fragmento en la secuencia genómica en *D. melanogaster* (Impl3). Los fragmentos situados en la región promotora se indican como 1 y 2 y los situados en el intrón 1 como a y b. En las siguientes filas se presentan los genes ortólogos en *D. pseudoobscura* (GA10121) y *D. virilis* (GJ11996). C : % de conservación respecto a *Drosophila melanogaster*. P : posición respecto al inicio de la transcripción.



Gen	2 (320 pb)		1 (150 pb)		a (380 pb)		b (103 pb)		c (264 pb)	
	C	P(pb)	C	P(pb)	C	P(pb)	C	P(pb)	C	P(pb)
CG4726		-1591		-1362		+285		+1190		+1465
GA18388	50%	-3368	65%	-3145	53%	+347	49%	+1304	68%	+1519
GJ19520	54%	-3077	62%	-5532	52%	+334	61%	+1538	58%	+1919

Figura 19. Conservación genómica en el gen CG4726 de *Drosophila melanogaster*. A.- Se muestran las regiones genómicas, la zona 5' y primer intrón, conservadas entre *D. melanogaster*, *pseudoobscura* y *virilis* (cajas de color marrón). El primer exón y el principio del segundo se marca en naranja. La posición del inicio de la transcripción (+1) esta indicada con una flecha. B.- se presenta una tabla indicando, en la parte superior, el tamaño de cada fragmento en la secuencia genómica en *D. melanogaster* (CG4726). Los fragmentos situados en la región promotora se indican como 1 y 2 y los situados en el intrón 1 como a, b y c. En las siguientes filas se presentan los genes ortólogos en *D. pseudoobscura* (GA18388) y *D. virilis* (GJ19520). C : % de conservación respecto a *Drosophila melanogaster*. P : posición respecto al inicio de la transcripción.



Gen	2 (728 pb)		1 (948 pb)		a (168 pb)		b (67 pb)	
	C	P(pb)	C	P(pb)	C	P(pb)	C	P(pb)
CG14598		-1540		-77		+386		+725
GA13104	52%	-1714	61%	-97	68%	+470	63%	+763

Figura 20. Conservación genómica en el gen CG14598 de *Drosophila melanogaster*. A.- Se muestran las regiones genómicas, la zona 5' y primer intrón, conservadas entre *D. melanogaster* y *pseudoobscura* (cajas de color marrón). El primer exón y el principio del segundo se marca en naranja. La posición del inicio de la transcripción (+1) esta indicada con una flecha. B.- se presenta una tabla indicando, en la parte superior, el tamaño de cada fragmento en la secuencia genómica en *D. melanogaster* (CG14598). Los fragmentos situados en la región promotora se indican como 1 y 2 y los situados en el intrón 1 como a y b. En las siguientes filas se presentan los genes ortólogos en *D. pseudoobscura* (GA13104). C : % de conservación respecto a *Drosophila melanogaster*. P : posición respecto al inicio de la transcripción.

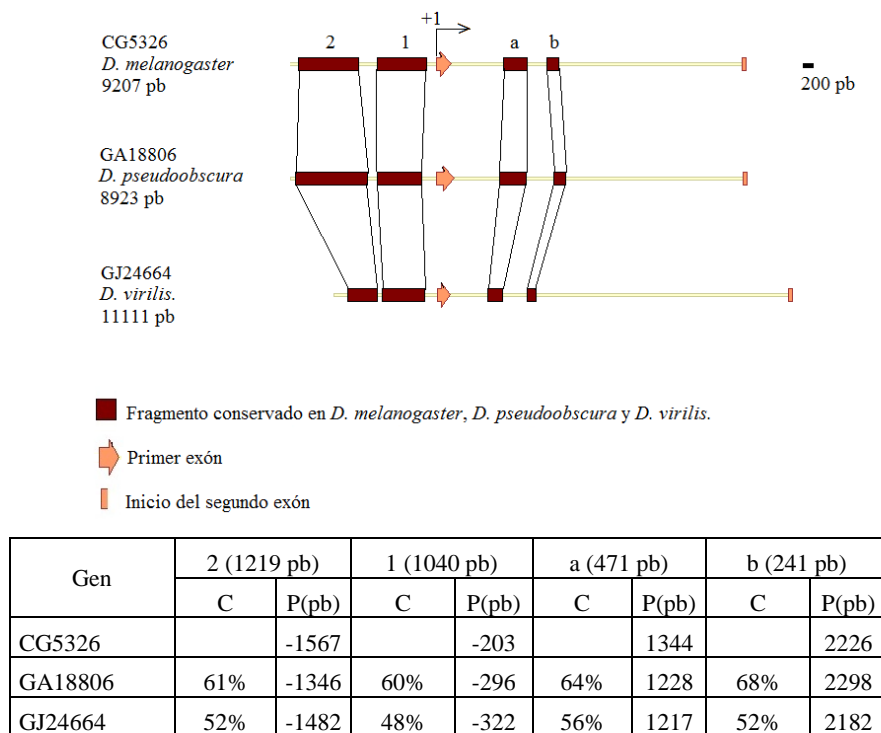
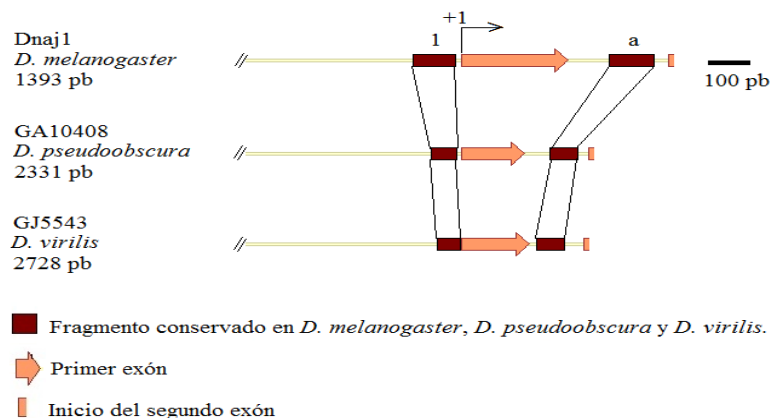


Figura 21. Conservación genómica en el gen CG5326 de *Drosophila melanogaster*. A.- Se muestran las regiones genómicas, la zona 5' y primer intrón, conservadas entre *D. melanogaster*, *pseudoobscura* y *virilis* (cajas de color marrón). El primer exón y el principio del segundo se marca en naranja. La posición del inicio de la transcripción (+1) esta indicada con una flecha. B.- se presenta una tabla indicando, en la parte superior, el tamaño de cada fragmento en la secuencia genómica en *D. melanogaster* (CG5326). Los fragmentos situados en la región promotora se indican como 1 y 2 y los situados en el intrón 1 como a y b. En las siguientes filas se presentan los genes ortólogos en *D. pseudoobscura* (GA18806) y *D. virilis* (GJ24664). C : % de conservación respecto a *Drosophila melanogaster*. P : posición respecto al inicio de la transcripción.

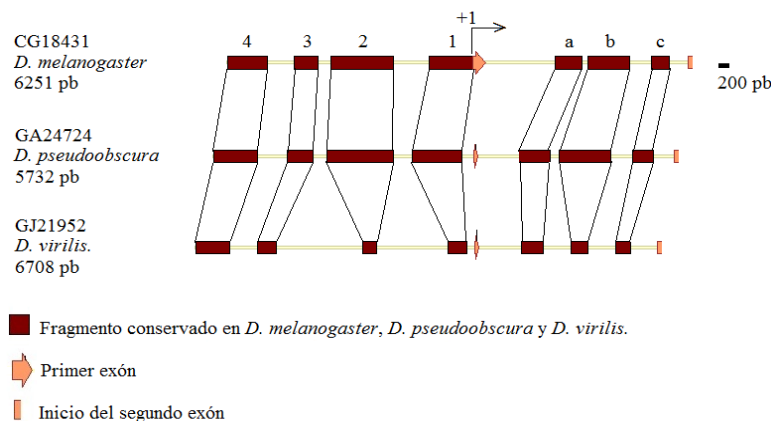
En el caso del gen CG5326, la comparación con sus ortólogos con los de las otras dos especies reveló, al igual que en el caso del gen CG14598 que la región 5' del gen aparecen 2 regiones conservadas de gran tamaño, en este caso 1219 y 1040 pb respectivamente, y porcentaje de conservación de mayor del 50%. En contraste, en la región intrónica, aparecen dos regiones de menor tamaño, 471 y 241 pb, y un nivel de conservación algo mayor que en la región 5' (figura 21).

Por último, en el gen Dna-j cabe destacar que solo se localizaron dos regiones evolutivamente conservadas, una situada en la región 5' del gen muy próxima al origen de transcripción y otra en el intrón 1 (figura 22). Por el contrario el gen CG18431 presenta cuatro regiones conservadas en la secuencia 5' promotora de entre 323 y 854 pb y tres en el primer intrón, ninguna de las cuales está dividida en sus ortólogos en *D. pseudoobscura* y *D. virilis* (figura 23).



Gen	1 (106 pb)		a (114 pb)	
	C	P(pb)	C	P(pb)
DnaJ-1		-14		366
GA10408	51%	-21	56%	367
GJ5543	61%	-6	51%	368

Figura 22. Conservación genómica en el gen DNAJ-1 de *Drosophila melanogaster*. A.- Se muestran las regiones genómicas, la zona 5' y primer intrón, conservadas entre *D. melanogaster*, *pseudoobscura* y *virilis* (cajas de color marrón). El primer exón y el principio del segundo se marca en naranja. La posición del inicio de la transcripción (+1) esta indicada con una flecha. B.- se presenta una tabla indicando, en la parte superior, el tamaño de cada fragmento en la secuencia genómica en *D. melanogaster* (DNAJ-1). Los fragmentos situados en la región promotora se indican como 1 y los situados en el intrón 1 como a. En las siguientes filas se presentan los genes ortólogos en *D. pseudoobscura* (GA10408) y *D. virilis* (GJ5543). C : % de conservación respecto a *Drosophila melanogaster*. P : posición respecto al inicio de la transcripción.



Gen	4 (548 pb)		3 (323 pb)		2 (846 pb)		1 (599 pb)		a (368 pb)		b (562 pb)		c (238 pb)	
	C	P(pb)	C	P(pb)	C	P(pb)	C	P(pb)	C	P(pb)	C	P(pb)	C	P(pb)
CG18431		-2792		-2107		-1079		-1		1118		1569		2433
GA24724	59%	-2687	69%	-2005	54%	-993	55%	-143	68%	284	63%	1069	73%	1985
GJ21952	55%	-3466	54%	-2751	50%	-1418	49%	-104	57%	697	51%	1425	55%	2069

Figura 23. Conservación genómica en el gen CG18431 de *Drosophila melanogaster*. A.- Se muestran las regiones genómicas, la zona 5' y primer intrón, conservadas entre *D. melanogaster*, *pseudoobscura* y *virilis* (cajas de color marrón). El primer exón y el principio del segundo se marca en naranja. La posición del inicio de la transcripción (+1) esta indicada con una flecha. B.- se presenta una tabla indicando, en la parte superior, el tamaño de cada fragmento en la secuencia genómica en *D. melanogaster* (CG18431). Los fragmentos situados en la región promotora se indican como 1, 2, 3 y 4 y los situados en el intrón 1 como a, b y c. En las siguientes filas se presentan los genes ortólogos en *D. pseudoobscura* (GA24724) y *D. virilis* (GJ21952). C : % de conservación respecto a *Drosophila melanogaster*. P : posición respecto al inicio de la transcripción.

En el transcurso de este trabajo se secuenció el genoma de las 12 especies de *Drosophila* (Clark, Eisen et al. 2007). Para completar nuestro estudio, decidimos ampliar el análisis realizado a las 12 *Drosophilidae* con objeto de validar los resultados obtenidos (figura 24), (Clark, Eisen et al. 2007)). Para ello utilizamos los alineamientos múltiples pre computados que están disponibles en el servidor “Genome Browser” de la Universidad de California en Santa Cruz (UCSC) (Fujita, Rhead et al. 2011). Los resultados de este análisis confirmaron, en general, lo que habíamos observado en el primer análisis utilizando únicamente tres especies. La mayor parte de las regiones identificadas en el primer análisis (figuras 18 - 23) contenían a su vez fragmentos conservados entre las 12 especies cuyos tamaños medios oscilan entre los 50 y 120 pb (figura 24 y tabla IV). Curiosamente, las regiones a y c en Impl3, 1, b y c en CG4726 y la región 4 en CG18431 no mostraron conservación entre las 12 *Drosophilidae* a pesar de estar conservadas entre las tres especies analizadas inicialmente.

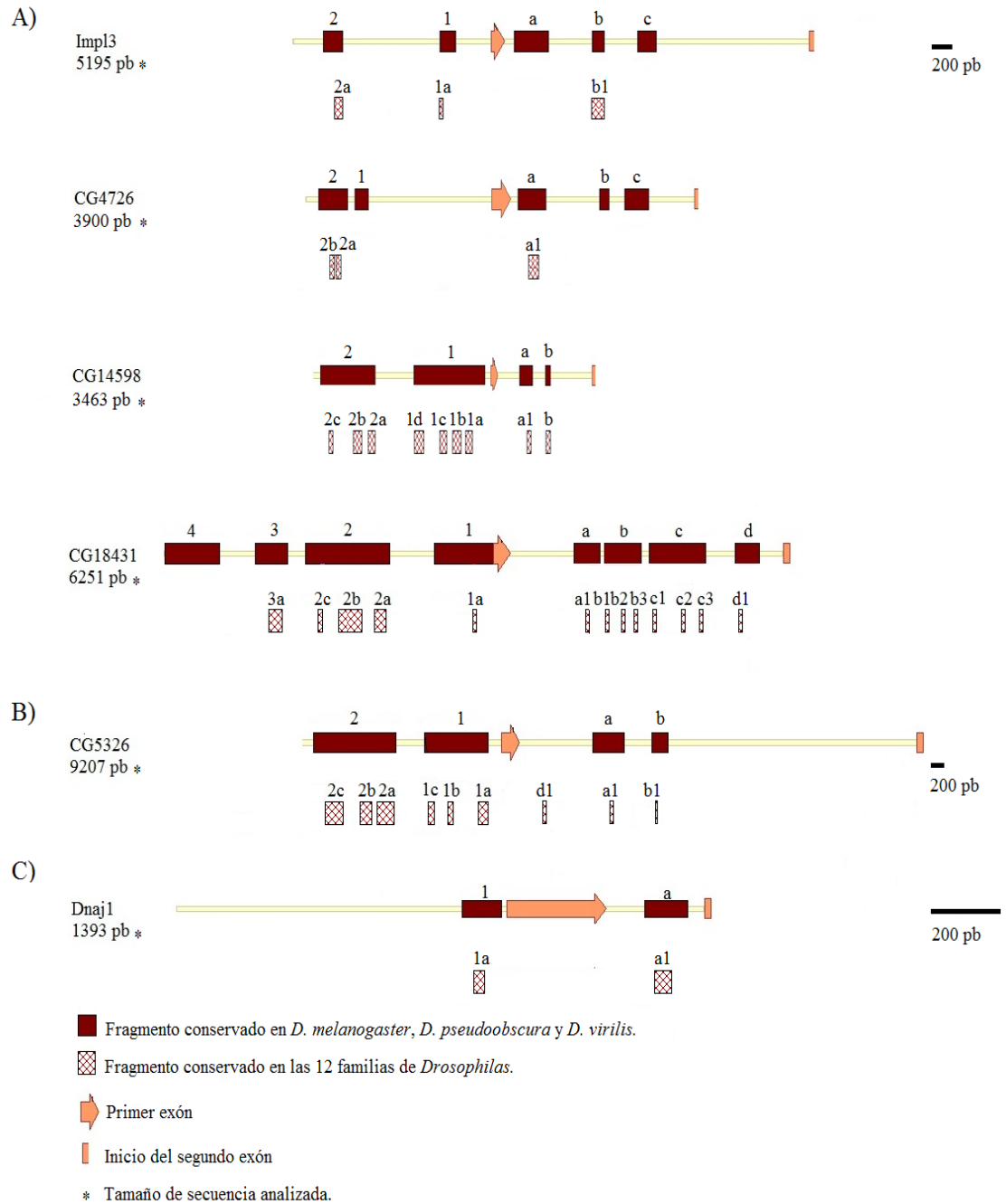


Figura 24. Conservación genómica de los genes solapantes en 12 *Drosophilidae*. Las cajas de color marrón etiquetadas con los números 1, 2, 3 y 4, y con las letras a, b, c y d nos indica la conservación genómica al comparar las secuencias de *D. melanogaster*, *pseudoobscura* y *virilis*. Las cajas con líneas finas de color rojo entrecruzadas indica la conservación genómica al comparar las 12 familias de *Drosophilas*. Las escalas correspondientes están puestas en la parte superior derecha de cada uno de los paneles A, B, y C. Los genes que se presentan en el panel A (Impl3, CG4726, CG14598 y CG18431) están a la misma escala, que es diferente a los de B y C.

A continuación, y con objeto de refinar nuestro estudio, tratamos de identificar posibles sitios de unión a factores de transcripción en las regiones identificadas en el análisis con las 12 *Drosophilidae*. Para ello se utilizó la base de datos TF Search (Heinemeyer, Wingender et al. 1998) y se seleccionaron únicamente aquellos sitios de unión para potenciales reguladores que presentaron un score de 90 sobre 100. Las secuencias identificadas como potenciales sitios de unión a factores de transcripción resultaron ser regiones ricas en A/T. Así se identificaron posibles sitios de unión a Cf2, Hb y el Dfd (Tautz 1988; Stanojevic, Hoey et al. 1989; Treisman and Desplan 1989; Kuziora and McGinnis 1990; Diederich, Pattatucci et al. 1991; Hsu, Bagni et al. 1996; Mantrova and Hsu 1998; Bagni, Bray et al. 2002; Novotny, Eiselt et al. 2002; Fu, Zhao et al. 2003; Bowser and Tobe 2007; Garcia-Zaragoza, Mas et al. 2008; Hardway, Mukhopadhyay et al. 2008; Papatsenko and Levine 2008; Tanaka, Bryantsev et al. 2008; Villanyi, Papp et al. 2008) en al menos cinco de los seis genes analizados. El único factor para el que se identificaron posibles sitios de unión en los seis genes fue BR-C-Z (broad complex zinc) (Sandstrom, Bayer et al. 1997; Liu and Restifo 1998; Sandstrom and Restifo 1999; Tzolovsky, Deng et al. 1999; Chen, O'Keefe et al. 2002). Esto resultó especialmente interesante ya que este factor de transcripción ha sido previamente implicado en el comienzo de la metamorfosis, siendo uno de los primeros factores que responden a ecdysona (Gonzy, Pokholkova et al. 2002). Es más, este factor de transcripción ha sido implicado en el control del metabolismo celular a través de la regulación de la piruvato kinasa (Hsiao, Zhu et al. 2002), lo que podría ser relevante en condiciones de microgravedad. BRC-Z es un factor de transcripción que presenta un dominio de unión a DNA tipo dedo de zinc y cuya función como regulador de la metamorfosis está conservada al menos entre los insectos holometabolos (Emery, Bedian et al. 1994).

Gen	2a		1a		b1	
	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)
Imple3	60	1262	110	494	178	961

Gen	2b		2a		a1	
	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)
CG4726	45	-1700	50	-1631	100	451

Gen	2c		2b		2a		1d		1c		1b		1a		a1		b	
	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)
CG14598	47	-2110	119	-1716	85	-1540	134	-892	91	-596	111	-402	96	-246	52	475	67	725

Gen	3a		2c		2b		2a		1a		a1		b1		b2		b3		c1		c2		c3		d1		d1	
	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)
CG18431	145	-2784	33	-2389	234	-1993	122	-1748	50	-817	50	760	50	257	50	464	50	624	30	756	50	940	50	1221	49	1413	124	1221

Gen	2c		2b		2a		1c		1b		1a		a1		b1	
	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)	T	P(pb)
CG5326	270	-2347	170	-1927	240	-1607	85	-1016	90	-712	160	-203	44	1658	29	2282

Gen	1		a	
	T	P(pb)	T	P(pb)
Dnaj-1	68	-36	68	384

Tabla IV. Conservación de regiones reguladas entre las 12 *Drosophilidae*. Se muestra, para los 6 genes en estudio, el tamaño de cada fragmento conservado en la secuencia genómica de *D. melanogaster*. Los fragmentos conservados entre las 12 especies estudiadas situados en la región promotora se indican con números y los situados en el intrón 1 con letras (ver figuras 18 a 23). La letra T nos indica el tamaño de pares de base de la zona conservada y P indica la posición desde el inicio de la transcripción.

4.3. Análisis de expresión temporal en embriones

Una vez estudiadas las posibles regiones reguladoras de los seis genes seleccionados para el estudio se decidió analizar sus perfiles de expresión durante el desarrollo embrionario. Adicionalmente, se estudio el patrón de expresión mediante hibridación “in situ”. El objetivo de estos experimentos fue estudiar si los seis genes en estudio presentaban una co-regulación temporal durante el desarrollo embrionario. Para ello, se recogieron embriones silvestres cada dos horas y se analizó por RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) el nivel de expresión de cada uno de los genes en cada punto temporal. Cuando se llevaron a cabo estos análisis, el gen CG18431 no estaba anotado en las bases de datos, por lo que no se dispone de datos sobre su perfil de expresión durante el desarrollo.

Como se muestra en la figura 25, este grupo de genes no parece estar co-regulado, al menos en el desarrollo embrionario ya que cada uno de ellos presenta un patrón temporal de

expresión diferente. Así, por ejemplo, los genes CG14598 y DNAj-1 no tienen contribución materna. Igualmente solo CG4726 no se expresa en las últimas etapas del desarrollo embrionario. Sin embargo, se pueden apreciar algunas similitudes en sus perfiles de expresión temporal embrionaria. Así, en cuatro de los casos estudiados, tiene un pico de expresión de 14 a 16 horas. En el único caso en que este pico no se aprecia, este resultado podría deberse a un problema técnico. Además en todos los casos en que se detecta expresión durante el desarrollo, esta disminuye progresivamente en el tiempo antes de casi desaparecer a las 12 horas.

El paso siguiente consistió en analizar el patrón de expresión embrionario por hibridación *in situ*. Para ello se recogieron y fijaron puestas de embriones de 18 horas y se hibridaron con las diferentes ribosondas sentido y anti-sentido marcadas con digoxigenina. Se describe a continuación el patrón de expresión para cada uno de los seis genes. Es importante mencionar que para el gen DNAj-1 no se obtuvo señal en las hibridaciones, a pesar de haber utilizado diferentes sondas, y protocolos de fijación e hibridación. Los resultados que se presentan proceden de las hibridaciones realizadas en el “Berkeley *Drosophila* Genome Project” (<http://www.fruitfly.org/>). Así mismo, los resultados para el gen CG18431, que en el momento de realizar estos experimentos no estaba anotado, proceden de esta misma base de datos.

IMPL3

Impl3 comienza a expresarse en el estadio 4, presentando una expresión restringida al extremo anterior del embrión (figura 26A). A continuación se detecta expresión en el mesodermo tanto de la cabeza como del tronco hasta el estadio 12 (figura 26B). A partir del estadio 13 la expresión se restringe a la musculatura somática embrionaria, donde se detecta expresión hasta el final del desarrollo embrionario (figura 26C y D). En estas últimas etapas, también se detecta expresión en los espiráculos posteriores (datos no mostrados).

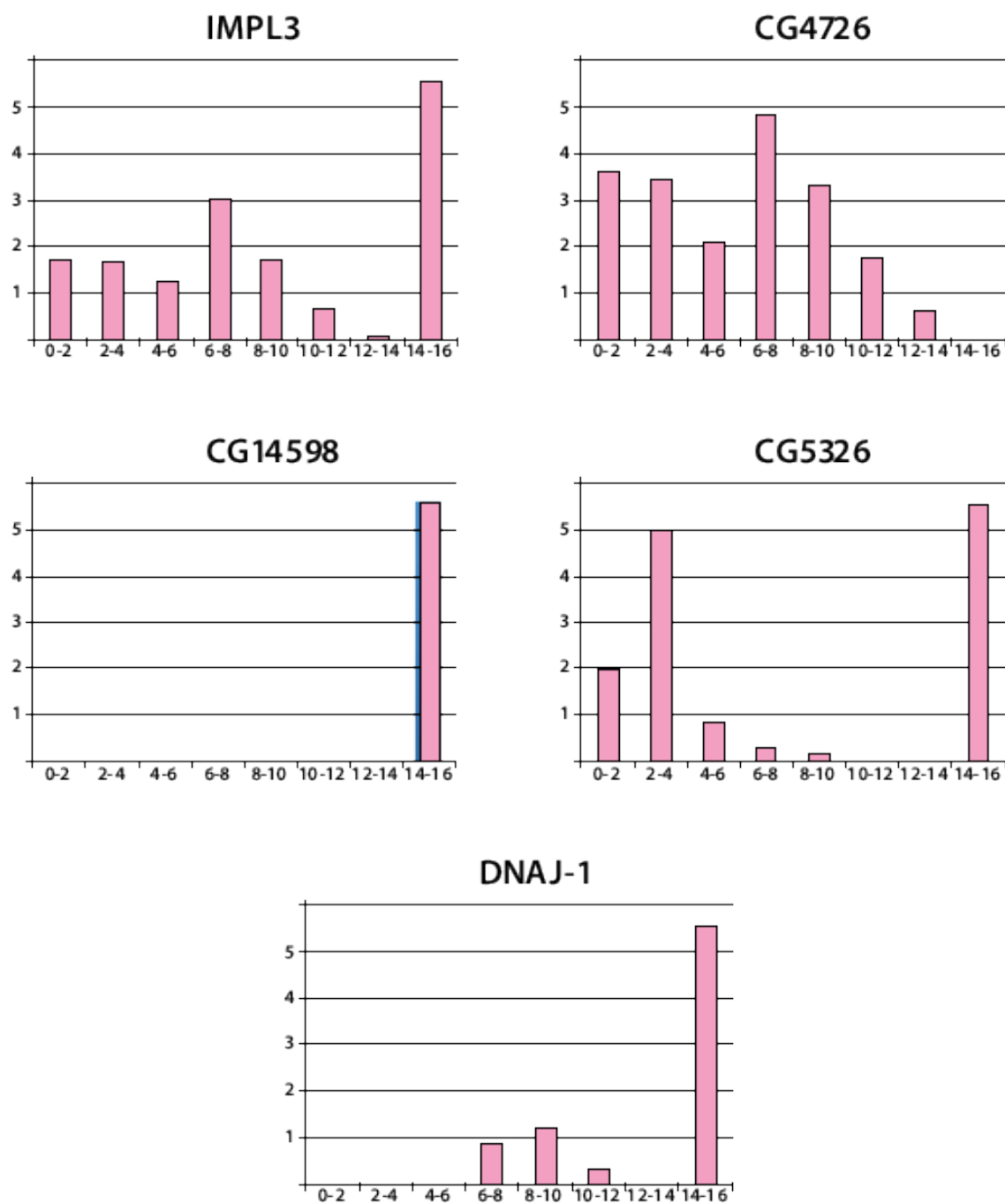


Figura 25. Análisis de la expresión temporal durante el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*. Se muestra el resultado de un experimento típico de RT-PCR sobre RNA de embriones en diferentes etapas del desarrollo. En la parte superior se muestra los periodos de tiempo analizados. A la derecha aparece el tamaño de la banda amplificada en cada caso. **A.-** Impl3. **B.-** CG4726. **C.-** CG14598. **D.-** CG5326. **E.-** DNAj-1.

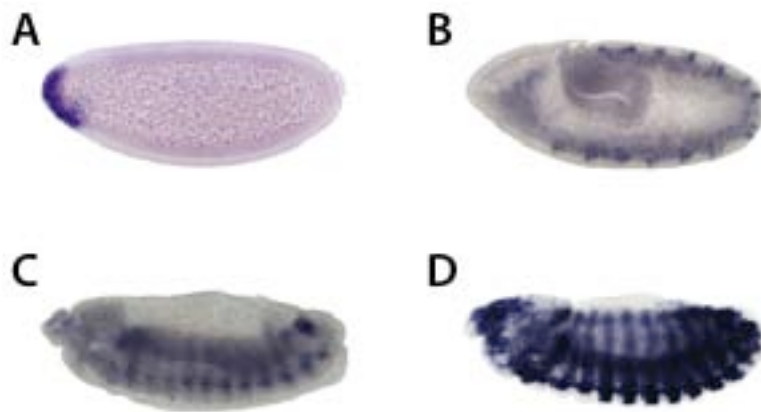


Figura 26. Patrón de expresión embrionario de Impl3. Se presentan embriones en etapas representativas del desarrollo. **A.-** Estadio 4. **B.-** Estadio 10. **C.-** Estadio 14. **D.-** Estadio 16. En todos los casos se muestra la región anterior a la izquierda y la posterior a la derecha.

CG4726

CG4726 inicia su expresión en el estadio 10 a 12 no detectándose expresión alguna hasta esta etapa, aproximadamente a las 5 horas y media tras la fertilización (figura 27 A a C). En esta etapa se detecta expresión en el mesodermo presuntivo así como a lo largo del tubo digestivo en formación. Posteriormente, a partir del estadio 13, la expresión se extiende a la mayoría de los tejidos, sistema nervioso, tubo digestivo, epidermis, glándula linfática, sistema traqueal y musculatura somática, siendo especialmente fuerte en este último (figura 27 D).

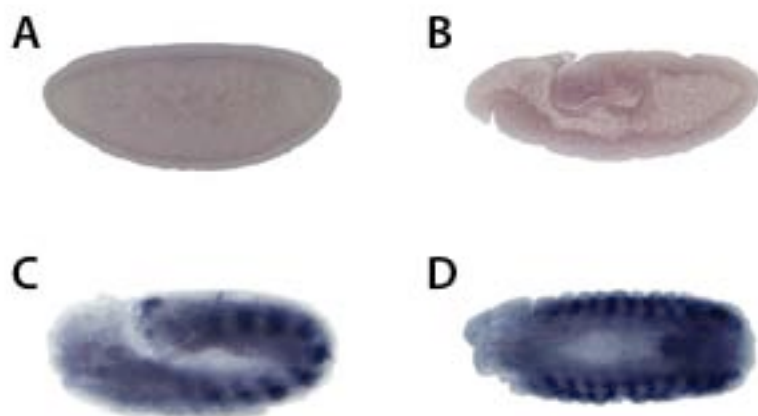


Figura 27. Patrón de expresión embrionario de CG4726. Se presentan embriones en etapas representativas del desarrollo. **A.-** Estadio 4. **B.-** Estadio 9. **C.-** Estadio 13. **D.-** Estadio 16. En todos los casos se muestra una visión lateral, excepto el panel D (dorsal), la región anterior a la izquierda y la posterior a la derecha.

CG14598

Los resultados obtenidos para el gen CG14598 indican que su expresión es muy tardía en el desarrollo. Concretamente comienza su expresión en los estadios 13-16. Es interesante destacar que su expresión, al contrario que en los demás genes estudiados, esta restringida a regiones muy definidas del embrión: los espiráculos posteriores y en la epidermis dorsal (figura 28 A y B).



Figura 28. Patrón de expresión embrionario de CG14598. Se presentan embriones en etapas representativas del desarrollo. **A.-** Estadio 14. **B.-** Estadio 16. En ambos casos se muestra la región anterior a la izquierda y la posterior a la derecha.

CG5326

En el caso del gen CG5326, los datos de RT-PCR demuestran que este gen se expresa en el embrión de *Drosophila* durante la práctica total del desarrollo, es más, de los seis genes en estudio este es el único que presenta contribución materna. Sin embargo no hemos sido capaces de detectar su expresión tisular a pesar de haber utilizado diferentes sondas y protocolos de hibridación. Es mas, tampoco las hibridaciones realizadas en el “Berkeley *Drosophila* Genome Project” (<http://www.fruitfly.org/>) muestran datos de la expresión embrionaria de este gen.

DNAJ-1 y CG18431

Los resultados que se presentan para estos dos genes se han tomado de las hibridaciones realizadas en el “Berkeley *Drosophila* Genome Project” (<http://www.fruitfly.org/>) tal y como se menciona mas arriba.

El gen DNAJ-1 muestra, por hibridación in situ, expresión materna aunque esta no aparece en nuestros experimentos de RT-PCR cuantitativa (figuras 25 y 29A). En su expresión cigótica, DNAJ-1 se expresa en el etapa de blastodermo en bandas poco definidas en la región central del embrión (figura 29B). Posteriormente, hacia el estadio 11 incrementa su expresión mostrando un patrón mas definido, expresándose en s regiones correspondientes a la epidermis así como el futuro sistema traqueal (figura 29C). Finalmente en las últimas etapas del desarrollo embrionario el gen DNAJ-1 se expresa en toda la epidermis y el tubo digestivo (figura 29D).

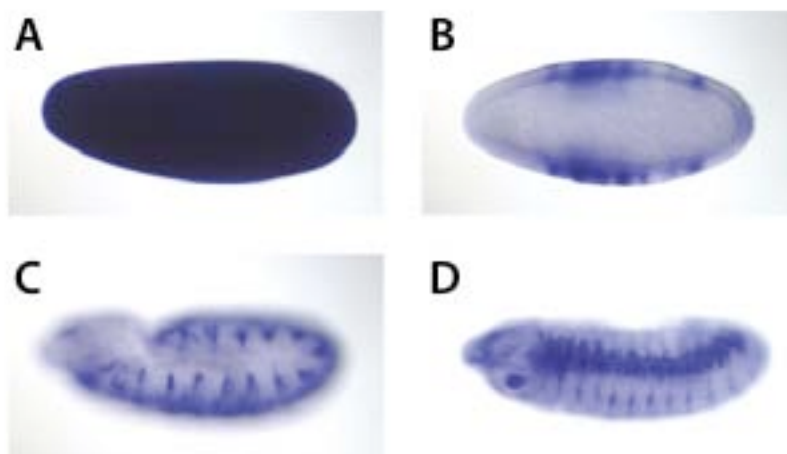


Figura 29. Patrón de expresión embrionario de DNAj-1. Se presentan embriones en etapas representativas del desarrollo. **A.-** Estadio 1. **B.-** Estadio 4. **C.-** Estadio 11. **D.-** Estadio 14. En todos los casos se muestra una visión lateral, excepto el panel B (dorsal), la región anterior a la izquierda y la posterior a la derecha.

En relación con la expresión del gen CG18431, su expresión no comienza hasta el estadio 11 en el que se detecta en la región cefálica así como en las regiones que darán origen al tubo digestivo y el sistema traqueal así como en la futura epidermis. Este patrón de expresión se mantiene durante las siguientes etapas para hacerse más intensa en la región de la cabeza en las últimas etapas, a partir del estadio 16 (figura 30).

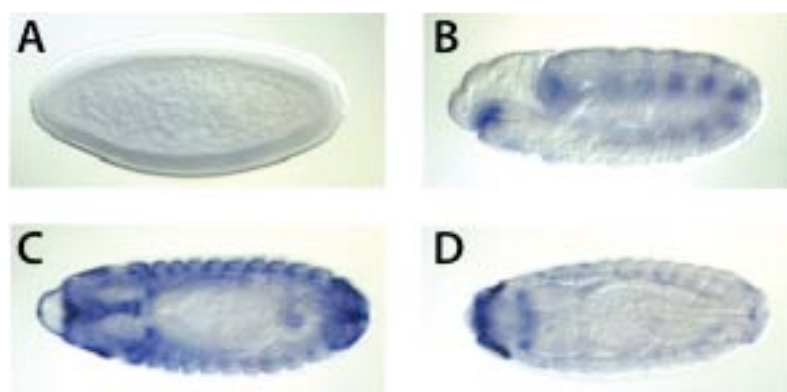


Figura 30. Patrón de expresión embrionario de CG18431. Se presentan embriones en etapas representativas del desarrollo. **A.-** Estadio 4. **B.-** Estadio 9. **C.-** Estadio 13. **D.-** Estadio 16. Paneles A y B visión lateral, panel C y D visión dorsal, en todos los casos se presenta la región anterior a la izquierda y la posterior a la derecha.

4.4. Validación en microgravedad simulada del experimento GENE

Durante la realización del experimento GENE, las muestras debían ser preparadas en los laboratorios de la ESA en Estec, Holanda, para luego ser transportadas a Baikunur, Siberia, desde donde se realizaría el lanzamiento. El desarrollo de la pupa de *Drosophila* dura 5 días por lo que el tiempo requerido para la preparación de las muestras y su posterior transporte hacia imposible la realización del experimento. Para solucionar este problema, las muestras, y los respectivos controles, fueron preparados a 14°C y mantenidos a esta temperatura hasta que se llevo a cabo el lanzamiento. En principio, el mantenimiento de las pupas a baja temperatura únicamente debería de ralentizar el desarrollo de las mismas sin tener mayores efectos sobre los perfiles de expresión génica, aunque esta última posibilidad no podía ser descartada a priori. Teniendo en cuenta estas condiciones experimentales, nos plantemos si los genes identificados no estarían respondiendo a las bajas temperaturas en lugar de a la microgravedad.

Por ello nos plantemos repetir el experimento GENE en condiciones de microgravedad simulada omitiendo el tratamiento de los especímenes a 14°C. El objetivo principal de este experimento era estudiar por qRT-PCR el comportamiento de los 6 genes identificados mediante el análisis bio-informático de los datos de microarrays obtenidos a partir del experimento GENE. La idea era repetir los experimentos en tierra, en microgravedad simulada utilizando la Random Position Machine (RPM) y en gravedad normal (1g). Estos experimentos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio Espacial Europeo de Estec. En particular, se pretendía validar las variaciones de expresión descritas para los seis genes identificados durante el proceso de pupación de la mosca. Además, nos planteamos ampliar el experimento al estudio del comportamiento de los seis genes durante el desarrollo del embrión. Así, la primera parte de experimento era someter a los embriones y a las pupas a ausencia de gravedad, durante 21 horas y 4,5 días respectivamente, y a continuación obtener a partir de estas muestras el mRNA y hacer RT-PCR cuantitativa para analizar los efectos de la gravedad sobre la expresión de los genes identificados.

Se realizaron por cuadruplicado, dos tipos de experimentos:

1) Se recogieron 3 grupos de 7 pupas en su primera hora de pupación. Se mantuvieron en microgravedad simulada en la RPM durante 4 días y medio, 110 horas, a 22 °C. El objetivo era que las pupas estuvieran la mayor parte del proceso de pupación sometidas a ingravidez simulada. Un segundo grupo de pupas fue mantenido el mismo tiempo en gravedad normal y a la misma temperatura (Ver esquema en figura 31).

2) Se recogieron puestas de embriones de una hora a 22°C y se mantuvieron durante 21 horas en el simulador de microgravedad RPM a esta temperatura. Paralelamente, se realizó el mismo proceso con un segundo grupo de embriones fuera de la RPM. El desarrollo del embrión termina en aproximadamente 24 horas a 22°C, por lo que prácticamente todo el desarrollo embrionario se producía en ausencia de gravedad.




Día - 0	Día - 3,5	Día - 7	Día - 11,5	Día - 30
<p><u>Inicio del experimento</u></p> <p>Adultos de 12 horas de edad se mantuvieron a 22°C durante 3,5 días.</p> 	<p>Extracción de los adultos</p> <p>Desarrollo de las larvas durante 3,5 días</p> 	<p><u>Inicio RPM</u></p> <p>Recogida de las pupas</p> <p>Desarrollo de las Pupas durante 4,5 días en la RPM</p> 	<p>Recogida y congelación de las pupas en N₂ líquido</p>	<p>Purificación RNAs y qRT-PCR</p>

Figura 31. Esquema del experimento realizado para someter a las pupas a gravedad simulada en ausencia de incubación en frío. El esquema muestra los pasos que se siguieron para la realización del experimento. Las pupas se mantuvieron en microgravedad simulada durante 4 días y medio, días 7 a 11,5. Tanto el experimento como el control a gravedad normal se llevaron a cabo a 22°C.

El estudio por qRT-PCR del comportamiento de los 6 genes identificados a partir del experimento GENE en condiciones de microgravedad simulada a 22°C reveló que el descenso de la expresión observada en estos genes en el análisis del experimento GENE se debió, al menos en parte, a la ausencia de gravedad. En la figura 32 se muestra la comparación de los resultados obtenidos en el experimento GENE y en la repetición del mismo sin frío. Las barras verdes muestran los niveles de expresión de los seis genes en una situación de micro gravedad simulada a 22°C, en comparación con los controles a gravedad normal. Como se puede observar todos los genes analizados mostraron genes que muestran una caída en sus niveles de expresión respecto a los controles en gravedad normal. Es más, en el caso de los genes Impl3, CG4726 y CG5326 la correlación entre los niveles de expresión en la ISS y la microgravedad simulada en ausencia de frío es muy alta. Sin embargo, en el experimento omitiendo la incubación de las pupas a 14 °C (barras verdes) se observa que el descenso en los niveles de expresión de estos genes en respuesta a la microgravedad simulada es mucho menor que cuando se realizó esta incubación (comparar barras rojas y verdes, figura 32). Esto sugiere que

el frío fue un factor importante en la respuesta de estos genes a la microgravedad en el experimento original, si bien no es la causa de todos los cambios observados.

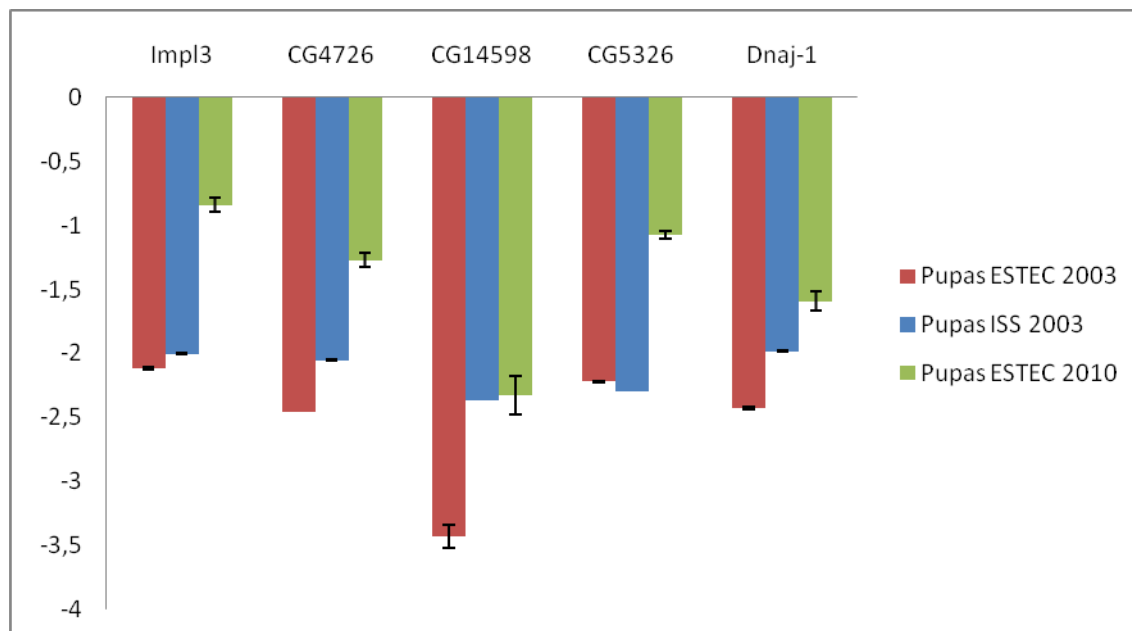


Figura 32. Niveles de expresión de 5 de los seis genes solapantes en la ISS y en microgravedad simulada. Se muestran los niveles de expresión de los cinco genes medidos por RT-PCR con sondas Taq-Man. Se muestran los niveles de expresión relativos su expresión en gravedad normal. Como gen endogeno se utilizo el 18S. Las columnas rojas muestran los resultados obtenidos en microgravedad simulada en el experimento inicial. Las columnas azules los obtenidos en la ISS. Las columnas verdes muestran los resultados obtenidos en microgravedad simulada en 2010.

A continuación, y para comprobar la especificidad de estos resultados, decidimos estudiar la respuesta a la microgravedad simulada en genes cuya expresión a) disminuye pero no pertenece al grupo identificado genes solapantes (*mef2*), b) no varía (*cf2*) y c) se incrementa como respuesta a la microgravedad (*CG5703*, *Surf1*, *CG8885* y *CG1970*). *Mef2*, *CG5703*, *Surf1*, *CG8885* y *CG1970* fueron identificados en el análisis inicial como pertenecientes al grupo de los que responden a microgravedad (figuras 8 y 14). De los seis genes analizados, únicamente *CG8885* y *Surf1* mostraron variaciones significativas en el experimento realizado por entero a 22°C respecto a lo observado en el experimento inicial en el que se sometió a las pupas a una incubación a 14°C (figura 33). El resto de los genes bien disminuye su expresión en la misma medida que lo hizo en el experimento original (*mef2*), no muestra una variación (*cf2*) o incrementa su expresión en aproximadamente la misma medida que lo hizo en el experimento original (figura 33). Por el contrario, tanto *CG8885* como *CG1970* incrementan su expresión significativamente en respuesta a la microgravedad al omitir la incubación a 14°C. Este resultado es básicamente el mismo que el obtenido en el caso de los genes solapantes, cuya expresión es significativamente mayor cuando las pupas se someten a microgravedad simulada sin incubarlas previamente a 14°C (figuras 32 y 34, comparar barras rojas y verdes). Estos datos,

por tanto, confirman nuestra conclusión inicial: las variaciones de expresión observadas en el grupo de genes que hemos denominado solapantes se debe en gran medida a la incubación en frío previa a la exposición de las pupas a microgravedad, real o simulada.

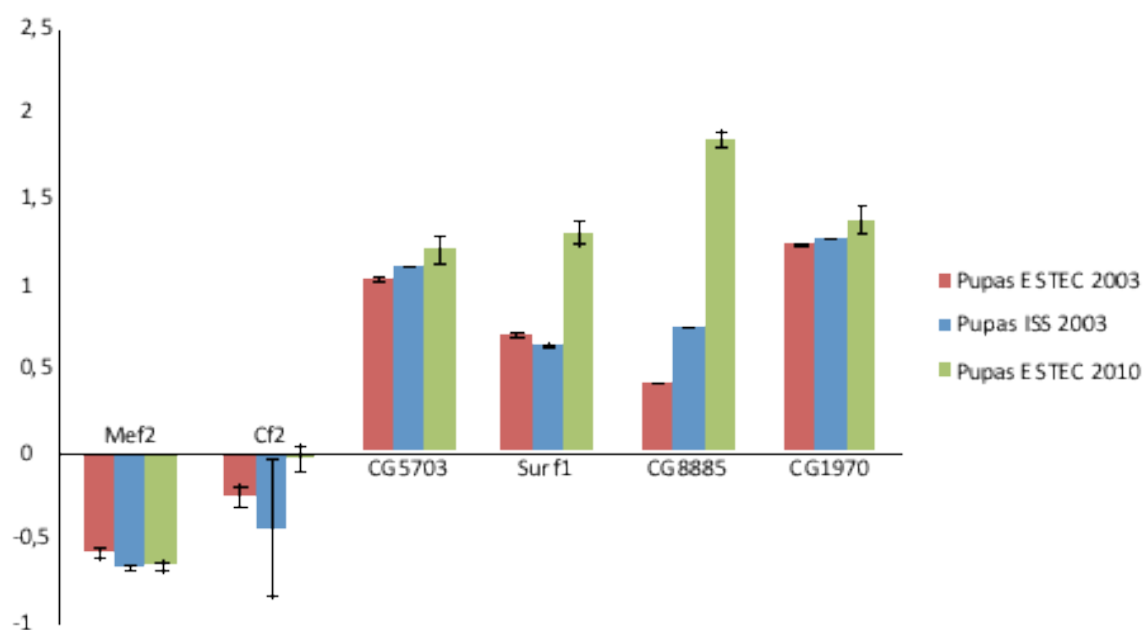


Figura 33. Niveles de expresión genes no solapantes en la ISS y en microgravedad simulada. Se muestran los niveles de expresión medidos por RT-PCR de dos genes cuya expresión no vario sustancialmente en el experimento inicial, Mef2 y Cf2, y cuatro genes cuya expresión se incrementa microgravedad real o simulada. Se muestran los niveles de expresión relativos su expresión en gravedad normal. Como gen endógeno se utilizo el 18S. Las columnas rojas muestran los resultados obtenidos en microgravedad simulada en el experimento inicial. Las columnas azules los obtenidos en la ISS. Las columnas verdes muestran los resultados obtenidos en microgravedad simulada en 2010.

Finalmente, decidimos estudiar si la exposición a microgravedad altera de alguna manera los niveles de expresión de los denominados genes solapantes en el embrión. Si las variaciones observadas al estudiar la expresión de estos genes en pupas se debieran fundamentalmente a una respuesta a la exposición a microgravedad, lo más probable es que en el embrión se observara un descenso de los niveles de expresión respecto a los niveles observados en gravedad normal. Para ello se recogieron tres grupos de embriones durante una hora y se sometieron a microgravedad simulada en la RPM durante las siguientes 20 horas. Una segunda serie de tres puestas de embriones fue mantenida a gravedad normal como control. A continuación se extrajo el RNA de ambas poblaciones y se analizo la expresión de los genes solapantes por qRT-PCR. El experimento se realizo tres veces, por lo que cada uno de los genes fue medido en 9 muestras. Los resultados se muestran en la figura 34. Como se puede observar, los cinco genes analizados muestran un aumento en sus niveles de expresión de aproximadamente 0,5 veces respecto a los controles en gravedad normal.

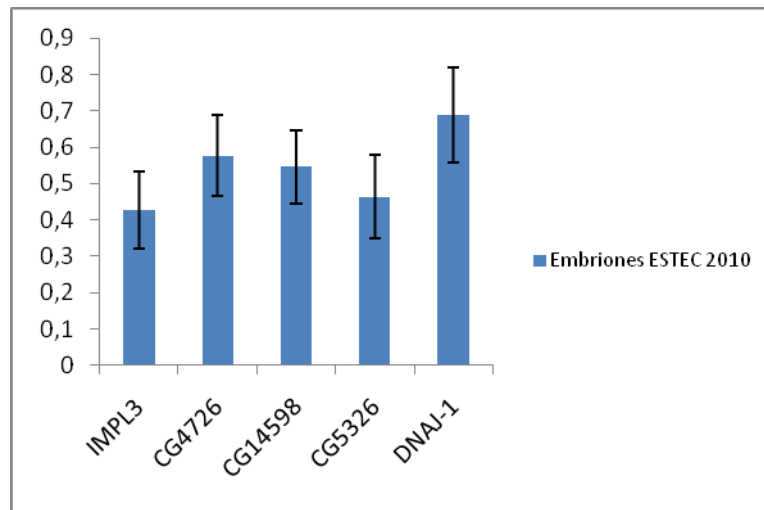


Figura 34. Niveles de expresión embrionaria de 5 de los seis genes solapantes en microgravedad simulada. Se muestran los niveles de expresión de los cinco genes medidos por RT-PCR con sondas Taq-Man. Se muestran los niveles de expresión relativos su expresión en gravedad normal. Como gen endógeno se utilizó el 18S.

DISCUSIÓN

5.1. LA GRAVEDAD EN EL PROCESO DEL DESARROLLO

El papel que ha desempeñado la gravedad en el desarrollo de los organismos vivos ha tenido un impacto en la evolución (Dubinin and Vaulina 1976). Dubinin concluyó que las fuerzas gravitacionales determinan la forma y el tamaño de los organismos, y su presencia era indispensable para el desarrollo esquelético de los organismos. Todos los organismos terrestres, incluyendo al hombre, se han adaptado a la gravedad mediante el desarrollo de una serie de mecanismos biológicos, aun hoy prácticamente desconocidos. La variación del campo gravitatorio en cualquier dirección provoca numerosos cambios en el desarrollo de los organismos. Sin embargo, como los organismos vivos detectan y son influidos por la fuerzas de la gravedad y como responden para adaptarse a nuevas situaciones sigue siendo una incógnita. Estas son preguntas claves que la biología espacial desea responder. En muchas ocasiones, astronautas y otros organismos vivos están largos periodos de tiempo en el espacio (Brinckmann, Frobin et al. 2007). Los experimentos desarrollados en el Agencia Espacial Internacional desde los años 80 del pasado siglo hasta el año 2003 que fue cuando se llevo a cabo la misión Cervantes, utilizando *Drosophila* han permitido concluir que, aunque el desarrollo es mas lento en el espacio se generan individuos básicamente normales. Ahora bien, también se demostró que existen algunos efectos importantes que si tienen una incidencia sobre la vida de la mosca. Así, hoy se sabe que cuando un embrión o una larva se desarrolla en el espacio o en microgravedad simulada en tierra, se produce un desarrollo retardado del embrión, se altera el citoesqueleto, se afectan las crestas mitocondriales produciendo una posible cambio de su función (Marco, Benguria et al. 1996), se altera el proceso de la ovógenesis (Marco, Gonzalez-Jurado et al. 1992), se afecta el sistema inmune de la mosca (Marcu, Lera et al. 2011) y la mosca envejece antes (Miquel and Fleming 1984). También se demostró que la radiación cósmica existente en la órbita baja, donde se está moviendo la Estación Espacial Internacional, no genera mutaciones en embriones, larvas ni pupas de *Drosophila melanogaster* (Marco, Gonzalez-Jurado et al. 1992).

En 2003, con los experimentos GENE y AGEING de la misión Cervantes, se planteó estudiar por primera vez si el transcriptoma de *Drosophila* sufre cambios significativos en exposiciones largas a microgravedad. La hipótesis era que solo un grupo pequeño de genes responderían realmente a ausencia de gravedad como se había identificado en sistemas unicelulares (Wilson et al, 2002). Estos experimentos fueron posibles gracias al desarrollo de la tecnología de microarrays y al desarrollo del laboratorio biológico espacial en la Estación Internacional.

Las exposiciones a microgravedad a las que sometieron las pupas, tanto las que estuvieron en el espacio como las que se mantuvieron en la Random Position Machine que era realmente un análogo 3D del clinostato que simulaba microgravedad en tierra, fueron de cuatro días lo que supone que todo el desarrollo de la pupa se realizó en situación de microgravedad. Durante esta etapa la pupa sufre el proceso de metamorfosis que produce grandes cambios metabólicos, fisiológicos y además en esa etapa se da también la organogénesis del adulto. Sin embargo, está demostrado que finalmente emerge sin ningún tipo de alteración visible. El análisis inicial del transcriptoma a partir del mRNA extraído de estas pupas demuestra que los patrones de respuesta a gravedad son realmente mucho más complejos de lo esperado. Prácticamente todos los genes presentes en la placa de Affimetrix de *Drosophila* (14.010 genes) responden a microgravedad (figura 6). Incluso algunos más que fueron estudiados por otros laboratorios en otras condiciones (Armstrong et al, 2006). El análisis de los datos de niveles de expresión se realizó usando algoritmos standards para este tipo de estudios, MAS 5.0 y R-AffymGUI. Los cambios de expresión detectados están en un rango medio entre 2-3 veces de aumento o disminución con respecto a los controles de tierra. La mayor parte de los genes responde a la microgravedad real o simulada de una forma similar, es decir incrementan su expresión o disminuyen su expresión (figuras 8-11). Muy pocos genes se podían encontrar en el segundo o en el cuarto cuadrante que serían los que tienen una respuesta diferente (figuras 8-11). En muy pocos casos, según se usara el algoritmo MAS 5.0 o el algoritmo R-AffymGUI, se aprecian variables de difícil interpretación.

El análisis por microarrays de los niveles de expresión ha revolucionado muchos aspectos de la biología y se seguirá aplicando ampliamente. Sin embargo, las preguntas siguen abiertas en lo que respecta a la interpretación de los datos. La validación de los resultados obtenidos de los microarrays mediante técnicas independientes aún es considerada un componente deseable de cualquier experimento. Para facilitar la comparación de datos entre grupos de investigación, es importante que la comunidad adopte metodologías de validación coherente, debido a que cualquier método estadístico que se utilice para el análisis de datos refleja la misma tendencia en los resultados. Esto lo podemos observar viendo las figuras 8 y 9. Sin embargo, la elección de una metodología de validación sigue siendo una cuestión discutida (Rockett 2003). En nuestro estudio, los niveles de expresión de algunos de estos genes fueron validados por qRT-PCR (figura 35 y 36). La correspondencia entre valores obtenidos por microarrays y por qRT-PCR es suficiente, aunque los datos revelan una sobreestimación de los resultados obtenidos en los ensayos de microarrays de las muestras que estuvieron en IIS (figura 35)

presentaran una variación en su expresión mayor o igual a 2 veces frente al control de tierra se obtuvo un grupo de 807 genes usando el programa MAS 5.0 y 722 genes usando el programa R-AffymGUI. Los resultados eran significativos ya que la mayor parte de ellos coincidían y si su expresión aumentaba o disminuía lo hacía también independientemente del algoritmo utilizado. En ninguno de los dos análisis se pudo identificar un grupo de genes pequeño y significativo que pudieran ser candidatos a actuar como sensores de gravedad en la mosca. Todos estos genes eran genes con funciones metabólicas o estructurales (Herranz, Benguria et al. 2010). Adicionalmente, se vio que la comparación de los datos obtenidos mediante los programas MAS5.0 y el R-AffymGUI (figura 10 y 11), mostraba que ambos grupos de datos tenían un coeficiente de correlación diferente, luego los genes identificados por cada algoritmo no eran necesariamente los mismos. Finalmente, la comparación entre ambos dio un grupo de 500 genes que solapaban entre ambos (figura 13). El número de genes que se seleccionaban de esta manera seguía siendo relativamente alto.

Esto nos llevo a poner a punto en el laboratorio un nuevo método de correlación que proviene de la fusión de los dos algoritmos utilizados, MAS5 de Affymetrix y el R-AffymGUI (RMA) del Bioconductor, para analizar microarrays que son los que se suelen utilizar mas frecuentemente (ver Materiales y Métodos). El método permite unificar el análisis de datos según el algoritmo MAS5.0 con el realizado mediante el algoritmo R-AffymGUI. Se han utilizado dos variables dinámicas, la primera de ellas corresponde a los valores de expresión seleccionados tras la aplicación de los filtros con el programa MAS 5.0 y la otra variable utilizada corresponde a los valores normalizados con el P-value según BH (Benjamine and Hochberg, 1995) obtenidos tras el análisis de los datos con el algoritmo R-AffymGUI. Con estas dos variables dinámicas se buscó un algoritmo que calculara las correlaciones correspondientes a las señales fluorescentes emitidas por la expresión de un grupo de mRNAs en los microarrays. Para obtener el algoritmo, se fijó primero el valor del P-value procedente del programa R-AffymGUI y sobre este valor se hizo variar los valores del Cut_off con pasos de 0.001 y 0,01 respectivamente. Por cada paso que realiza el algoritmo se calcula el nº de genes que se expresan en microgravedad real y simulada.

Aplicando el método de correlación se identificaron 804 genes que se mueven (incrementan o disminuyen su expresión) en la misma dirección. A partir de estos genes, mediante la aplicación del nuevo método de correlación se obtuvo una matriz que permitió la identificación de tres grupos de genes en base a sus coeficientes de correlación utilizando diferentes valores de Cut-off (figura 15). Sorprendentemente se encontraron seis genes que estaban presentes en mas de un grupo de correlación, los que se han denominado “genes solapantes” (Tabla III). Se puede observar en la tabla que los seis genes, ImpL3, DnaJ-1,

CG4726, CG18431, CG14598 y CG5326 presentan todos una disminución de su expresión que oscila entre 2-3 veces, tanto en los datos obtenidos del experimento de pupas sometidas a microgravedad real como la de las pupas que están sometida a microgravedad simulada, frente a la expresión en los controles en tierra.

La búsqueda de posibles funciones en la página de Berkeley *Drosophila* Genome Project (Tabla V; www.fruitfly.org) no reveló ninguna función en común de estos genes. Así, en la tabla V se indican las posibles funciones en base en a dominios encontrados en la secuencia de la proteína. Tres de ellas tienen una función conocida, ImpL3 que es la Lactato deshidrogenasa, DnaJ-1 que es un factor relacionado con la respuesta a stress, CG4726 que es un simportador Sodio-Fosfato inorganico y las otras tres, CG4726, CG5326 y CG1843, cuya función no esta claramente definida. Es relevante indicar que todos estos genes en el desarrollo normal de *Drosophila* aumentan su expresión en la etapa de pupas muy tempranas o larvas tardías, al contrario de cuando estan sometidas a microgravedad.

TABLA V

Gen	Función	Publicaciones
ImpL3	Lactato Deshidrogenasa (Ecdysone-inducible gene L3) Su expresión es ubicua en el embrión y adulto. Su expresión es muy alta en la etapa embrionaria tardía y en larvas tardías	(Alahiotis, Onoufriou et al. 1983)
DnaJ-1	Factor de respuesta a stress; mantiene reprimidos los genes que responden a stress. Se expresa en todas las etapas de desarrollo.	(Marchler and Wu 2001)
CG4726	Simportador Sodio-fosfato inorgánico de alta afinidad. Aumenta su expresión de una manera progresiva durante el desarrollo embrionario, su expresión mas alta la tiene en larvas para bajar de una forma progresiva en pupas	www.fruitfly.org
CG18431 (CG43164)	Proteína con un dominio frecuentemente encontrado en lectinas, dependiente de Calcio, función desconocida. Se expresa en etapas muy tempranas del desarrollo de pupas y también en la etapa tardía del desarrollo embrionario.	www.fruitfly.org
CG 14598	Función desconocida. Se expresa en etapas muy tempranas del desarrollo de pupas y también en la etapa tardía del desarrollo embrionario.	www.fruitfly.org
CG5326	Proteína N-glicosilada con un dominio GNS-SUR4. Se expresa en etapas muy tempranas del desarrollo de pupas y también en la etapa media/tardía del desarrollo embrionario. Neurogenesis; podría estar implicado en la síntesis de las ceramidas y esfingolipidos porque tiene un dominio GNS-SUR4	(Baycin-Hizal, Tian et al. 2011)

Se podría hipotetizar en relación con las posibles funciones de las proteínas que sintetizan estos genes que:

En el caso de la lactato deshidrogenasa es un enzima que participa en el metabolismo energético anaerobio. La caída de esta actividad en las pupas sometidas a microgravedad indicaría una acumulación del piruvato (procedente de la glucólisis) que si hay suficiente oxígeno seguiría la vía de entrada en la mitocondria produciendo más ATP. Además podría seguir otras vías alternativas que salen a partir del piruvato como la síntesis de ácidos grasos o de aminoácidos. Hay que puntualizar que no sería la situación para las pupas que estan en el espacio que al estar constreñidas en un contenedor especial la cantidad de O₂ esta restringida (el Berlingot)

DnaJ-1 es una proteína que participa en las vías de respuesta a stress reprimiendo a los genes que responden a stress. Al disminuir su expresión en las pupas sometidas a microgravedad, activa los genes que responden a stress. Entraría dentro de lo posible que cuando las pupas son sometidas a un entorno poco común para ellas como es la falta de gravedad en el espacio respondan activando la expresión de los genes de respuesta a stress. Los ensayos de microarrays no han detectado si la expresión de estos genes están también activados.

CG4726, CG5326 y CG18431 son proteínas anotadas de función desconocida. Las tres son proteínas que podrían estar relacionadas con funciones en membranas. Así, CG4726, es un simportador Na-P, CG5326 es una proteína glicosilada y CG18431 tiene un dominio de unión a lectinas. En la etapa de desarrollo de la pupa se produce un proceso importante de organogénesis para que pueda emerger la mosca. El papel de las membranas es realmente importante en estas etapas.

Como se ha comentado, estos genes tras ser sometidos a ausencia de gravedad responden reduciendo la expresión. Otra observación consistente es que la mayoría de esto genes, sino todos, presentan, durante el desarrollo, un aumento en los niveles de expresión en las pupas tempranas y responden a la hormona esteroidea 20-hidroxiecdisona (www.fruitfly.org). Durante la metamorfosis de *Drosophila* en la etapa de pupación, la larva, especializada en comer y crecer, se reorganiza completamente, y al final aparece el imago, con un cuerpo totalmente diferente. Este proceso esta regulado por esta hormona, 20-hidroxiecdisona. Algunos de los componentes identificados parecen ser genes claramente relacionados con una respuesta coordinada del organismo a una condición indefinida de stress. Microgravedad es un estímulo que un organismo vivo no ha experimentado nunca en la evolución biológica afectando indirectamente al ciclo celular y a la proliferación. Parece deducirse que la pupa

responde en un entorno de ausencia de gravedad de la misma manera que a cualquier otro entorno de stress (hipoxia, frio....)

La conclusión general de este análisis es que todos ellos se expresan en niveles altos en las etapas de pupas tempranas y que no había una correlación funcional clara entre ellos. Tratando de encontrar algún tipo de correlación y dado que todos ellos reprimían su expresión durante la pupación, el siguiente paso de este trabajo fue estudiar si estos genes presentaban una regulación coordinada espacio-temporal. El trabajo se enfocó hacia un estudio *in silico* de las regiones 5' promotoras y el intrón 1 de cada gen. Estudios de nuestro laboratorio y de otros habían demostrado que una parte importante de los elementos reguladores o “short-range enhancers” estaban localizados en estas dos regiones (Karlik and Fyrberg 1986; Mas, Garcia-Zaragoza et al. 2004; Garcia-Zaragoza, Mas et al. 2008). *Drosophila* tenía otra ventaja adicional para poder hacer estudios evolutivos in silico y era que se conocía la secuencia genómica de mas de 12 especies de *Drosophila* (Clark, Eisen et al. 2007)). Este estudio se realizó en dos etapas, la primera consistió en la comparación de las secuencias de tres especies de *Drosophila*: *melanogaster*, *pseudoobscura* y *virilis* que están separadas evolutivamente mas de 15 millones de años. La comparación de secuencias entre un número pequeño de especies facilita la identificación de regiones relativamente grandes en las zonas promotoras y en el intrón (figuras 18-23). En este estudio se buscaron regiones conservadas de mas de 100 pb y con una homología de mas del 50%. La búsqueda permitió identificar algunas regiones relativamente grandes y con una homología importante. En el gen IMPL3 se detectan 2 secuencias conservadas en la región 5' y 3 secuencias en el intrón. Todas ellas entre 120 y 340 pb y con una homología mayor del 50%. La comparación de estas regiones entre las 12 especies permite descartar dos de las regiones que están en el intrón y además seleccionar realmente las secuencias conservadas dentro de las regiones previamente identificadas. Estas secuencias evolutivamente conservadas suelen tener un tamaño de 50-100 pares de bases y con una homología relativamente alta (tabla IV). En el gen DnaJ-1 se detectan dos fragmentos de alrededor de 100 pb, una en la zona 5' y otra en el intrón, en la primera comparación y se confirma la existencia de fragmentos de unos 40 pb en esas regiones totalmente conservados en las 12 especies (figuras 22 y 24 y Tabla IV). Así, en el gen CG5326 (figura 21) se han detectado dos secuencias de mas de 1000 pares de bases con una homología de mas del 60% en la región 5' promotora. En este gen, la comparación con las 12 especies reveló claramente que estas regiones estaban muy conservadas con fragmentos dentro de ellas de mas de 200 pb (comparar figuras 21 y 24). Una situación parecida se aprecia en el gen CG14598 (figuras 20 y 24).

La búsqueda de posibles sitios de unión a factores de transcripción en estas regiones seleccionadas permitiría finalmente hipotetizar si estos seis genes compartían una regulación

coordinada, al menos, en alguna etapa del desarrollo. Se utilizó la base de datos TF Search (Heinemeyer, Wingender et al. 1998). El único factor para el que se identificaron posibles sitios de unión en los seis genes fue **BR-C-Z** (broad complex zinc) (Sandstrom, Bayer et al. 1997; Liu and Restifo 1998; Sandstrom and Restifo 1999; Tzolovsky, Deng et al. 1999; Chen, O'Keefe et al. 2002). **BRC-Z** presenta un dominio de unión a DNA tipo dedo de zinc y su función como regulador de la metamorfosis esta conservada al menos entre los insectos holometabolos (Emery, Bedian et al. 1994). Como se ha comentado antes, este proceso esta regulado por una hormona esteroidea, 20-hidroxiecdisona (20E). Esta hormona es responsable de inducir, entre otros, el Broad Complex (**BRC**) (FBgn0000210) como una respuesta secundaria que inicia la respuesta programada del desarrollo del adulto o imago (Constantino, B.F.B. et al, 2008). **BRC-Z** ha sido previamente implicado en el comienzo de la metamorfosis, siendo uno de los primeros factores que responden a ecdisona (Gonzy, Pokholkova et al. 2002). Así, se podría hipotetizar que una posible desregulación de la ecdisona, podría tener como consecuencia un cambio en la respuesta a través de **BRC-Z** que produciría una disminución de la expresión de estos seis genes entre otros. Mas aún, esta descrito que la mayoría de ellos son dependientes de ecdisona. Habría sido importante investigar si este factor esta desregulado en las pupas tempranas desarrolladas en microgravedad, real o simulada.

Otro aspecto importante a resaltar es que los resultados parecen indicar que la encrucijada metabólica del piruvato se altera en las pupas sometidas a microgravedad. Así, se ha descrito que **BRC-Z** esta implicado en el control del metabolismo celular a través de la regulación de la piruvato kinasa (Hsiao, Zhu et al. 2002), lo que podría ser relevante en condiciones de microgravedad. La piruvato kinasa es una enzima de la glucólisis que cataliza la transferencia de un grupo fosfato del fosfoenolpiruvato al adenosín difosfato (ADP), produciendo una molécula de piruvato y otra de adenosín trifosfato (ATP). Durante el proceso de pupación, como consecuencia de los posibles cambios en **BRC-Z**, la piruvato kinasa estaría desregulada y se producirían cambios en las cantidades de piruvato. Por otra parte, los resultados de microarrays demuestran que la expresión de la lactato deshidrogenasa en *Drosophila* (**IMPL3**) disminuye en las pupas desarrolladas en el espacio. La caída de esta actividad produciría una acumulación anómala del piruvato (procedente de la glucólisis). Además podría seguir otras vías alternativas que salen a partir del piruvato como la síntesis de ácidos grasos o de aminoácidos.

Los otros potenciales sitios de unión a factores de transcripción que se identificaron fueron regiones ricas en A/T. Estas secuencias unen factores de transcripción implicados en desarrollo embrionario temprano o musculares que no parecen ser los factores de transcripción candidatos para tener un papel esencial en la pupación (**Cf2** , **Hb** y el **Dfd**) (Tautz 1988;

Stanojevic, Hoey et al. 1989; Treisman and Desplan 1989; Kuziora and McGinnis 1990; Diederich, Pattatucci et al. 1991; Hsu, Bagni et al. 1996; Mantrova and Hsu 1998; Bagni, Bray et al. 2002; Novotny, Eiselt et al. 2002; Fu, Zhao et al. 2003; Bowser and Tobe 2007; Garcia-Zaragoza, Mas et al. 2008; Hardway, Mukhopadhyay et al. 2008; Papatsenko and Levine 2008; Tanaka, Bryantsev et al. 2008; Villanyi, Papp et al. 2008).

A continuación, se realizó mediante hibridación in situ y por qRT-PCR (figuras 25-28), el estudio del patrón de expresión espacio temporal durante el desarrollo embrionario, siguiendo con la idea de si estos genes tenían algo en común. Los patrones de expresión de los seis genes en embriones difieren bastante y no parecen revelar ninguna relación ni coordinación clara entre ellos.

La disparidad observada en los patrones de expresión espacial y temporal durante el desarrollo embrionario, la baja similitud encontrada en el análisis de las regiones reguladoras de los diferentes genes en estudio así como las diferencias funcionales entre ellos, hacia pensar en la posibilidad de que estos genes no respondieran realmente a micro-gravedad sino a algún otro estímulo. Un aspecto importante que no habíamos analizado previamente en estos seis genes y que empezamos a pensar que podría jugar un papel inesperado era el hecho de que las muestras se habían mantenido a 14°C durante el traslado desde Holanda a Siberia para realizar el lanzamiento. Está descrito que el único efecto que produce el mantenimiento de los embriones o pupas a baja temperatura es un enlentecimiento o parada del desarrollo (Parfyonov, Platonova et al. 1979; Miquel and Fleming 1984). Pero ¿afectaría a los resultados, el hecho de mantener las muestras varios días a esa temperatura?. Se procedió a repetir estos experimentos usando el simulador de microgravedad en tierra, en los laboratorios de ESTEC, Holanda. Las muestras, pupas recién iniciada la pupación, se mantuvieron 4,5 días en el simulador microgravedad en tierra a 22°C. Todo el proceso de desarrollo de estas pupas se produjo a 22°C, desde el embrión hasta la emergencia de los imagos. Los resultados de la cuantificación de la expresión de los seis genes en las pupas, mediante qRT-PCR, y su comparación con los resultados obtenidos en 2003 en el experimento GENE (figura 32) indican claramente que el descenso de la temperatura, de 22°C a 14 °C, durante el traslado de las muestras a Siberia para su envío a la Estación Internacional Espacial, juega un papel importante. Se observa que el descenso en los niveles de expresión de estos genes en respuesta a la microgravedad simulada es mucho menor en el experimento realizado a 22°C que en el experimento que se realizó a 14°C (comparar barras rojas y verdes, figura 32). Como control, se cuantificaron por qRT-PCR, los niveles de expresión de algunos genes mitocondriales del complejo I (CG5703, Surf1, CG8885 y CG1970) y los factores de transcripción musculares Mef2 y Cf2 en las muestras últimas obtenidas en 2010. Este conjunto de genes es parte de los 806 genes (ver figura 14) estadísticamente diferenciables obtenidos mediante el método de

correlación. El resultado indica que en todos estos genes la tendencia se mantiene frente a los resultados de 2003, es decir si aumentan siguen aumentando o si reducen siguen reduciendo su expresión, pero que el frío aumenta la tendencia.

Se puede concluir que la microgravedad produce una reducción de la expresión de estos seis genes pero que la reducción es menor de lo que sugería el experimento de 2003. La bajada de la temperatura (de 22°C a 14°C) aumenta la respuesta de estos genes a la microgravedad, si bien no es la causa de todos los cambios observados. Las reducciones de expresión están en un rango de 1 a 2 veces frente a la expresión en condiciones de gravedad en tierra. En la cuantificación de los niveles de expresión de los seis genes en embriones sometidos a microgravedad simulada, en un experimento que se realizó en paralelo, se observa un incremento de 0,4-0,7 de su expresión.

Dado el bajo número de muestras analizadas hasta la fecha, estos datos deberían de ser considerados preliminares a la espera de ser confirmados en experimentos futuros. Sin embargo, los datos presentados en este estudio, así como el análisis de los mismos realizado por otros grupos (Herranz, Benguria et al. 2010), parece confirmar la validez del uso de microgravedad simulada como aproximación previa a un análisis en la estación espacial. Además es importante, en futuros estudios, valorar que otras variables pueden afectar al análisis de la respuesta de los diferentes organismos a micro-gravedad. Así, la temperatura, como se muestra en este estudio, induce a sobrevalorar los efectos de la micro-gravedad o la limitación en la disponibilidad de oxígeno.

CONCLUSIONES

1. Se ha diseñado un nuevo método de análisis de microarrays denominado “método de correlación” que procede de la fusión de los algoritmos MAS5 y R-AffylimGui mediante el que se ha realizado el análisis de los datos obtenidos en el experimento GENE.
2. El análisis del transcriptoma demuestra que los patrones de respuesta a gravedad son realmente mucho mas complejos de lo esperado. Se ha determinado que al menos 806 genes de *Drosophila*, estadísticamente diferenciables, sufren cambios significativos en su expresión en respuesta a microgravedad real (ISS) y simulada (RPM).
3. La aplicación del método de correlación permitió identificar un grupo de seis genes: ImpL3, DnaJ-1, CG4726, CG18431, CG14598 y CG5326, que sufren una reducción de su expresión de entre 2-3 veces en respuesta tanto a microgravedad real (ISS) como simulada (RPM).
4. Se ha demostrado que la respuesta a microgravedad de estos seis genes es debida a la exposición a microgravedad aunque la exposición al frio (14°C) aumenta este efecto.
5. La comparación entre los resultados obtenidos en los experimentos en la Estación Espacial Internacional y los que se obtuvieron en tierra con la máquina de posiciones aleatorias (RPM) demuestran que este último es un buen simulador de microgravedad.
6. Los patrones de expresión espacio-temporal embrionaria y las funciones de estos seis genes no son coincidentes. Sin embargo, el perfil de expresión en pupas tempranas es similar.
7. Aun a pesar de que no tienen ninguna función biológica conocida común, el potencial sitio de unión al factor de transcripción BRC-Z4 es el único conservado en los elementos reguladores de los seis genes. Este factor juega un papel importante en el inicio de la metamorfosis que es cuando estos genes presentan un pico de expresión.
8. Los embriones de *Drosophila* no responden a la exposición a microgravedad de igual manera que las pupas, variando su expresión en respuesta a la misma un grupo de genes diferente al que lo hace en el estadio de pupa.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. D., S. E. Celniker, et al. (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." Science **287**(5461): 2185-95.
- Aimar, C., A. Bautz, et al. (2000). "Microgravity and hypergravity effects on fertilization of the salamander *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian)." Biol Reprod **63**(2): 551-8.
- Alahiotis, S. N., A. Onoufriou, et al. (1983). "Drosophila lactate dehydrogenase: developmental aspects." Biochem Genet **21**(1-2): 199-211.
- Anthony, P., J. Ausseil, et al. (1996). "Preservation of viable biological samples for experiments in space laboratories." J Biotechnol **47**(2-3): 377-93.
- Armstrong, J. D., M. J. Texada, et al. (2006). "Gravitaxis in *Drosophila melanogaster*: a forward genetic screen." Genes Brain Behav **5**(3): 222-39.
- Bagni, C., S. Bray, et al. (2002). "The *Drosophila* zinc finger transcription factor CF2 is a myogenic marker downstream of MEF2 during muscle development." Mech Dev **117**(1-2): 265-8.
- Bate, M. and A. Martinez (1993). "The Development of *Drosophila melanogaster*." Cold Spring Harbor Laboratory Press **1**: 287-93.
- Baycin-Hizal, D., Y. Tian, et al. (2011). "GlycoFish: a database of zebrafish N-linked glycoproteins identified using SPEG method coupled with LC/MS." Anal Chem **83**(13): 5296-303.
- Beier, M. and J. D. Hoheisel (1999). "Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips." Nucleic Acids Res **27**(9): 1970-7.
- Benguria, A., E. Grande, et al. (1996). "Microgravity effects on *Drosophila melanogaster* behavior and aging. Implications of the IML-2 experiment." J Biotechnol **47**(2-3): 191-201.
- Bernstein, S. I., P. T. O'Donnell, et al. (1993). "Molecular genetic analysis of muscle development, structure, and function in *Drosophila*." Int Rev Cytol **143**: 63-152.
- Bowser, P. R. and S. S. Tobe (2007). "Comparative genomic analysis of allatostatin-encoding (Ast) genes in *Drosophila* species and prediction of regulatory elements by phylogenetic footprinting." Peptides **28**(1): 83-93.
- Brinckmann, P., W. Frobin, et al. (2007). "Calculating the 2-D motion of lumbar vertebrae using splines." J Biomech **40**(14): 3294-5.
- Brown, E. E. and G. Schubiger (1977). "Centrifugation of developing oocytes leading to embryonic defects." Dev Biol **55**(1): 170-8.
- Campos-Ortega, J. A. and V. Hartenstein (1985). "The Embryonic development of *Drosophila melanogaster*." Springer-Verlag, Berlin **16**(10): 947-59.

- Castle, W. E. (1906). "Inbreeding, Cross-Breeding and Sterility in *Drosophila*." Science **23**(578): 153.
- Clark, A. G., M. B. Eisen, et al. (2007). "Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny." Nature **450**(7167): 203-18.
- Chen, L., S. L. O'Keefe, et al. (2002). "Control of Dopa decarboxylase gene expression by the Broad-Complex during metamorphosis in *Drosophila*." Mech Dev **119**(2): 145-56.
- Chen, L., A. Rao, et al. (1999). "Signal integration by transcription-factor assemblies: interactions of NF-AT1 and AP-1 on the IL-2 promoter." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **64**: 527-31.
- Davies, E., R. Hodge, et al. (1996). "Hybridization and detection of digoxigenin probes on RNA blots." Mol Biotechnol **6**(1): 75-7.
- de Juan, E., A. Benguría, et al. (2007). "The "ageing" experiment in the spanish soyuz mission to the international space station." Microgravity Science and Technology **19**(5): 170-174.
- De Maziere, A., J. Gonzalez-Jurado, et al. (1996). "Transient effects of microgravity on early embryos of *Xenopus laevis*." Adv Space Res **17**(6-7): 219-23.
- del Valle Rodriguez, A., D. Didiano, et al. (2011). "Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*." Nat Methods **9**(1): 47-55.
- Diederich, R. J., A. M. Pattatucci, et al. (1991). "Developmental and evolutionary implications of labial, Deformed and engrailed expression in the *Drosophila* head." Development **113**(1): 273-81.
- Dubinín, N. P. and E. N. Vaulina (1976). "The evolutionary role of gravity." Life Sci Space Res **14**: 47-55.
- Emerson, C. P., Jr. and S. I. Bernstein (1987). "Molecular genetics of myosin." Annu Rev Biochem **56**: 695-726.
- Emery, I. F., V. Bédian, et al. (1994). "Differential expression of Broad-Complex transcription factors may forecast tissue-specific developmental fates during *Drosophila* metamorphosis." Development **120**(11): 3275-87.
- Ferl, R., R. Wheeler, et al. (2002). "Plants in space." Curr Opin Plant Biol **5**(3): 258-63.
- Fiering, S., E. Whitelaw, et al. (2000). "To be or not to be active: the stochastic nature of enhancer action." Bioessays **22**(4): 381-7.
- Fodor, S. P., J. L. Read, et al. (1991). "Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis." Science **251**(4995): 767-73.
- Fu, D., C. Zhao, et al. (2003). "Enhancer sequences influence the role of the amino-terminal domain of bicoid in transcription." Mol Cell Biol **23**(13): 4439-48.
- Fujita, P. A., B. Rhead, et al. (2011). "The UCSC Genome Browser database: update 2011." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D876-82.

- Garcia-Zaragoza, E., J. A. Mas, et al. (2008). "CF2 activity and enhancer integration are required for proper muscle gene expression in *Drosophila*." Mech Dev **125**(7): 617-30.
- Gentleman, R. C., V. J. Carey, et al. (2004). "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics." Genome Biol **5**(10): R80.
- Gonzy, G., G. V. Pokholkova, et al. (2002). "Isolation and characterization of novel mutations of the Broad-Complex, a key regulatory gene of ecdysone induction in *Drosophila melanogaster*." Insect Biochem Mol Biol **32**(2): 121-32.
- Guasconi, V. and H. Yahi (2003). "Transcription Factors." Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol **254**(19): 9678-81.
- Hardway, H., B. Mukhopadhyay, et al. (2008). "Modeling the precision and robustness of Hunchback border during *Drosophila* embryonic development." J Theor Biol **254**(2): 390-9.
- Heinemeyer, T., E. Wingender, et al. (1998). "Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL." Nucleic Acids Res **26**(1): 362-7.
- Herranz, R., A. Benguria, et al. (2005). "Gene Expression Variations During *Drosophila* Metamorphosis in Space. The GENE Experiment in the Spanish Cervantes." J Gravit Physiol **12** (1)(22): 253-4.
- Herranz, R., A. Benguria, et al. (2010). "Spaceflight-related suboptimal conditions can accentuate the altered gravity response of *Drosophila* transcriptome." Mol Ecol.
- Herranz, R., D. A. Laván, et al. (2007). "'Gene' Experiment in the Spanish Soyuz Mission to the ISS. Effects of the cold transportation step." Microgravity Science and Technology **19**(9): 196 - 200.
- Herranz, R., D. A. Laván, et al. (2009). "*Drosophila* Gen Experiment in the Spanish Soyuz Mission to the ISS: II Effects of the Containment Constraints." Microgravity Science and Technology **21**(15): 299 - 304.
- Hsiao, P. F., Y. J. Zhu, et al. (2002). "Cloning and functional analysis of pyruvate kinase promoter region from *Drosophila melanogaster*." DNA Cell Biol **21**(1): 1-10.
- Hsu, T., C. Bagni, et al. (1996). "The transcriptional factor CF2 is a mediator of EGF-R-activated dorsoventral patterning in *Drosophila* oogenesis." Genes Dev **10**(11): 1411-21.
- Irizarry, R. A., B. Hobbs, et al. (2003). "Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data." Biostatistics **4**(2): 249-64.
- Karlik, C. C. and E. A. Fyrberg (1986). "Two *Drosophila melanogaster* tropomyosin genes: structural and functional aspects." Mol Cell Biol **6**(6): 1965-73.
- Katembe, W. J., R. E. Edelmann, et al. (1998). "The development of spaceflight experiments with *Arabidopsis* as a model system in gravitropism studies." J Plant Res **111**(1103): 463-70.

- Kohler, R. E. (1993). "Drosophila: a life in the laboratory." J Hist Biol **26**(2): 281-310.
- Kojima, Y., S. Sasaki, et al. (2000). "Effects of simulated microgravity on mammalian fertilization and preimplantation embryonic development in vitro." Fertil Steril **74**(6): 1142-7.
- Kordyum, E. L. (1997). "Biology of plant cells in microgravity and under clinostating." Int Rev Cytol **171**: 1-78.
- Kornberg, R. D. (1998). "Mechanism and regulation of yeast RNA polymerase II transcription." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **63**: 229-32.
- Kornberg, R. D. (1999). "Eukaryotic transcriptional control." Trends Cell Biol **9**(12): M46-9.
- Kuziora, M. A. and W. McGinnis (1990). "Altering the regulatory targets of the Deformed protein in Drosophila embryos by substituting the Abdominal-B homeodomain." Mech Dev **33**(1): 83-93.
- Leandro, L. J., N. J. Szewczyk, et al. (2007). "Comparative analysis of Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans gene expression experiments in the European Soyuz flights to the International Space Station." Adv Space Res **40**(4): 506-512.
- Liu, E. and L. L. Restifo (1998). "Identification of a broad complex-regulated enhancer in the developing visual system of Drosophila." J Neurobiol **34**(3): 253-70.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Mantrova, E. Y. and T. Hsu (1998). "Down-regulation of transcription factor CF2 by Drosophila Ras/MAP kinase signaling in oogenesis: cytoplasmic retention and degradation." Genes Dev **12**(8): 1166-75.
- Marco, R., A. Benguria, et al. (1996). "Effects of the space environment on Drosophila melanogaster development. Implications of the IML-2 experiment." J Biotechnol **47**(2-3): 179-89.
- Marco, R., E. de Juan, et al. (1994). "Arthropod model systems for studying complex biological processes in the space environment." Adv Space Res **14**(8): 215-27.
- Marco, R., C. Diaz, et al. (1999). "The role of gravity in the evolutionary emergence of multicellular complexity: microgravity effects on arthropod development and aging." Adv Space Res **23**(12): 2075-82.
- Marco, R., J. Gonzalez-Jurado, et al. (1992). "Microgravity effects on Drosophila melanogaster development and aging: comparative analysis of the results of the Fly experiment in the Biokosmos 9 biosatellite flight." Adv Space Res **12**(1): 157-66.
- Marco, R., D. Husson, et al. (2003). "Drosophila melanogaster and the future of 'evo-devo' biology in space. Challenges and problems in the path of an eventual colonization project outside the earth." Adv Space Biol Med **9**: 41-81.

- Marco, R., I. Vernos, et al. (1983). "[The possible role of cellular proto-oncogenes in early embryonic development]." Rev Esp Oncol **30**(4): 631-7.
- Marco, R., I. Vernos, et al. (1986). "Embryogenesis and aging of *Drosophila melanogaster* flown in the space shuttle. Preliminary analysis of experiment fly 15E." Naturwissenschaften **73**(7): 431-2.
- Marcu, O., M. P. Lera, et al. (2011). "Innate immune responses of *Drosophila melanogaster* are altered by spaceflight." PLoS One **6**(1): e15361.
- Marchler, G. and C. Wu (2001). "Modulation of *Drosophila* heat shock transcription factor activity by the molecular chaperone DROJ1." EMBO J **20**(3): 499-509.
- Mas, J. A., E. Garcia-Zaragoza, et al. (2004). "Two functionally identical modular enhancers in *Drosophila* troponin T gene establish the correct protein levels in different muscle types." Mol Biol Cell **15**(4): 1931-45.
- Miquel, J. and J. E. Fleming (1984). "A two-step hypothesis on the mechanisms of in vitro cell aging: cell differentiation followed by intrinsic mitochondrial mutagenesis." Exp Gerontol **19**(1): 31-6.
- Miquel, J. and D. Philpott (1978). Effects of weightlessness on development and aging of *Drosophila melanogaster*. Tel Aviv, *The Physiologist*.
- Muller, C. W. (2001). "DNA recognition by NF kappa B and STAT transcription factors." Ernst Schering Res Found Workshop(34): 143-66.
- Muller, C. W. (2001). "Transcription factors: global and detailed views." Curr Opin Struct Biol **11**(1): 26-32.
- Musgrave, M. E. and A. Kuang (2001). "Reproduction during spaceflight by plants in the family Brassicaceae." J Gravit Physiol **8**(1): P29-32.
- Novotny, T., R. Eiselt, et al. (2002). "Hunchback is required for the specification of the early sublineage of neuroblast 7-3 in the *Drosophila* central nervous system." Development **129**(4): 1027-36.
- Osborn, J. (2000). "A review of radioactive and non-radioactive-based techniques used in life science applications. Part I: Blotting techniques. Innovations Forum Life Science News 6." Amersham Pharmacia Biotech **1-4**(5): 275-9.
- Owens, N. C., F. M. Hess, et al. (2006). "In situ hybridization using riboprobes on free-floating brain sections." Methods Mol Biol **326**: 163-71.
- Padgett, R. W., R. D. St Johnston, et al. (1987). "A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family." Nature **325**(6099): 81-4.
- Papatsenko, D. and M. S. Levine (2008). "Dual regulation by the Hunchback gradient in the *Drosophila* embryo." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(8): 2901-6.

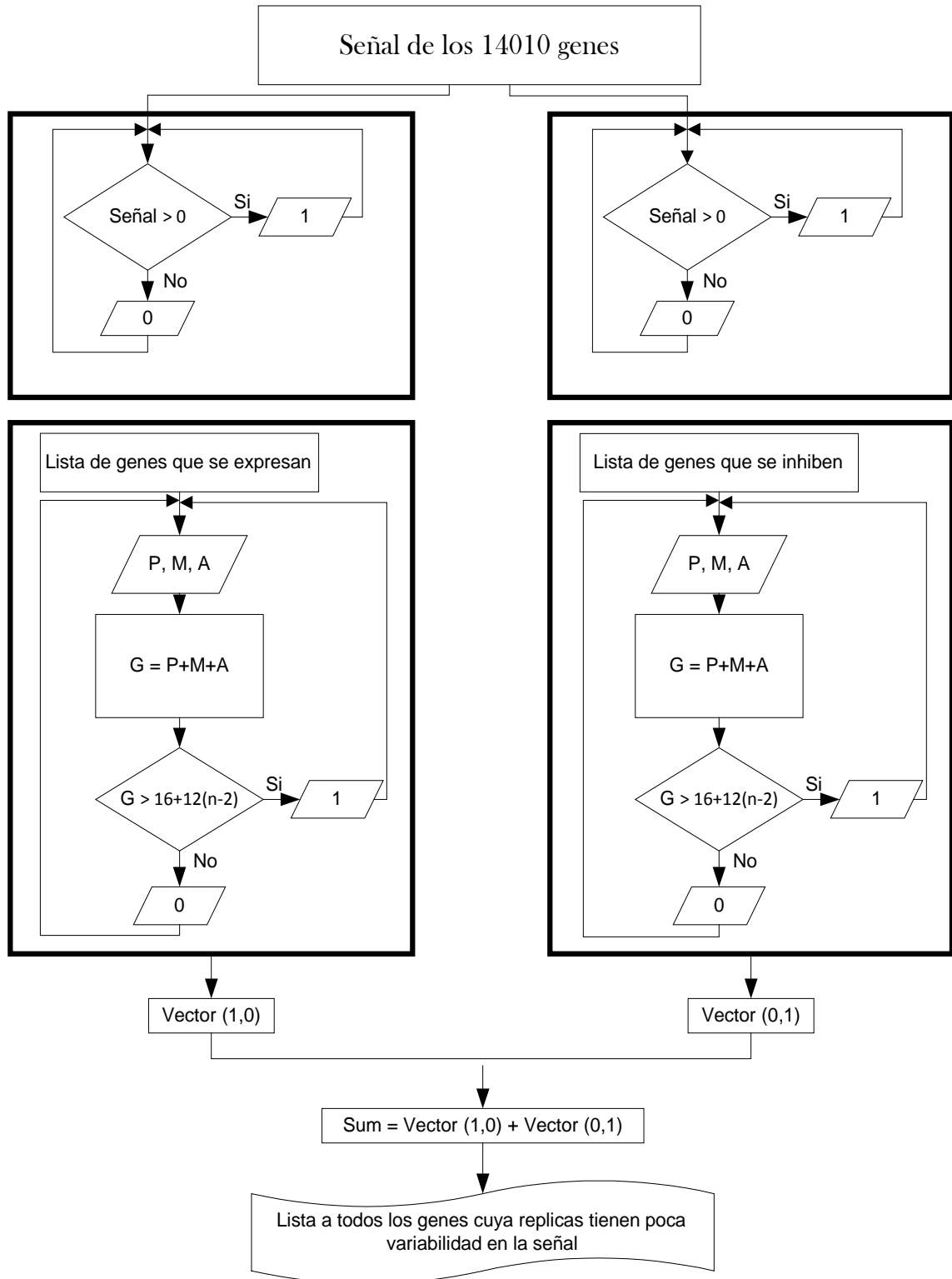
- Parfyonov, G. P., R. N. Platonova, et al. (1979). "Biological experiments carried out aboard the biological satellite Cosmos-936." Life Sci Space Res **17**: 297-9.
- Perbal, G. and D. Driss-Ecole (2002). "Contributions of space experiments to the study of gravitropism." J Plant Growth Regul **21**(2): 156-65.
- Perbal, G. and D. Driss-Ecole (2003). "Mechanotransduction in gravisensing cells." Trends Plant Sci **8**(10): 498-504.
- Peterson, S. W., Z. Jurjevic, et al. (2010). "Genus *Hamigera*, six new species and multilocus DNA sequence based phylogeny." Mycologia **102**(4): 847-64.
- Rockett, J. C. (2003). "To confirm or not to confirm (microarray data)--that is the question." Drug Discov Today **8**(8): 343.
- Rozen, S. and H. Skaletsky (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." Methods Mol Biol **132**: 365-86.
- Sambrook and Russell (2001). Molecular Cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., E. F. Fritsh, et al. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. . New York:, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, M. E., M. Shenasa, et al. (2005). "Development of the EMCS hardware for multigenerational growth of *Drosophila melanogaster* in space." Gravit Space Biol Bull **18**(2): 93-4.
- Sandstrom, D. J., C. A. Bayer, et al. (1997). "Broad-complex transcription factors regulate thoracic muscle attachment in *Drosophila*." Dev Biol **181**(2): 168-85.
- Sandstrom, D. J. and L. L. Restifo (1999). "Epidermal tendon cells require Broad Complex function for correct attachment of the indirect flight muscles in *Drosophila melanogaster*." J Cell Sci **112 (Pt 22)**: 4051-65.
- Scott, J. A., F. H. Collins, et al. (1994). "Diversity of cytochrome P450 genes in the mosquito, *Anopheles albimanus*." Biochem Biophys Res Commun **205**(2): 1452-9.
- Schena, M., D. Shalon, et al. (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." Science **270**(5235): 467-70.
- Schiaffino, S. and C. Reggiani (1996). "Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance." Physiol Rev **76**(2): 371-423.
- Serger, P. (1999). "Gene chips and DNA microarrays." MIT Bioinformatic and microarrays Center **7-9**(6): 50-5.
- Smyth, G., R. Gentleman, et al. (2005). "Limma: Linear Models for microarray data. In: Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor." Springer, New York **23**(4): 397-420.

- Souza, K. A. and S. D. Black (1985). "Amphibian fertilization and development in microgravity." Physiologist **28**(6 Suppl): S93-4.
- Stanojevic, D., T. Hoey, et al. (1989). "Sequence-specific DNA-binding activities of the gap proteins encoded by hunchback and Kruppel in Drosophila." Nature **341**(6240): 331-5.
- Sullivan, W. and M. Ashburner (2000). "Drosophila Protocols." Cold Spring Harbor Laboratory Press **36**(6): 486-9.
- Tanaka, K. K., A. L. Bryantsev, et al. (2008). "Myocyte enhancer factor 2 and chorion factor 2 collaborate in activation of the myogenic program in Drosophila." Mol Cell Biol **28**(5): 1616-29.
- Tautz, D. (1988). "Regulation of the Drosophila segmentation gene hunchback by two maternal morphogenetic centres." Nature **332**(6161): 281-4.
- Tixador, R., G. Richoilley, et al. (1981). "The CYTOS biological experiments carried out on the Soviet orbital station Salyut 6." Aviat Space Environ Med **52**(8): 485-7.
- Treisman, J. and C. Desplan (1989). "The products of the Drosophila gap genes hunchback and Kruppel bind to the hunchback promoters." Nature **341**(6240): 335-7.
- Tzolovsky, G., W. M. Deng, et al. (1999). "The function of the broad-complex during Drosophila melanogaster oogenesis." Genetics **153**(3): 1371-83.
- van Loon, J., F. Medina, et al. (2007). "The national – esa soyuz missions andromède, marco polo, odisea, cervantes, delta and eneide." Microgravity Science and Technology **19**(5): 9-32.
- Vernos, I., M. Carratala, et al. (1989). "Insects as test systems for assessing the potential role of microgravity in biological development and evolution." Adv Space Res **9**(11): 137-46.
- Vernos, I., J. Gonzalez-Jurado, et al. (1989). "Microgravity effects on the oogenesis and development of embryos of Drosophila melanogaster laid in the Spaceshuttle during the Biorack experiment (ESA)." Int J Dev Biol **33**(2): 213-26.
- Villanyi, Z., B. Papp, et al. (2008). "The DRE motif is a key component in the expression regulation of the importin-beta encoding Ketel gene in Drosophila." Mech Dev **125**(9-10): 822-31.
- Wettenhall, J. M. and G. K. Smyth (2004). "LimmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data." Bioinformatics **7**(4): 171-3.

ANEXOS

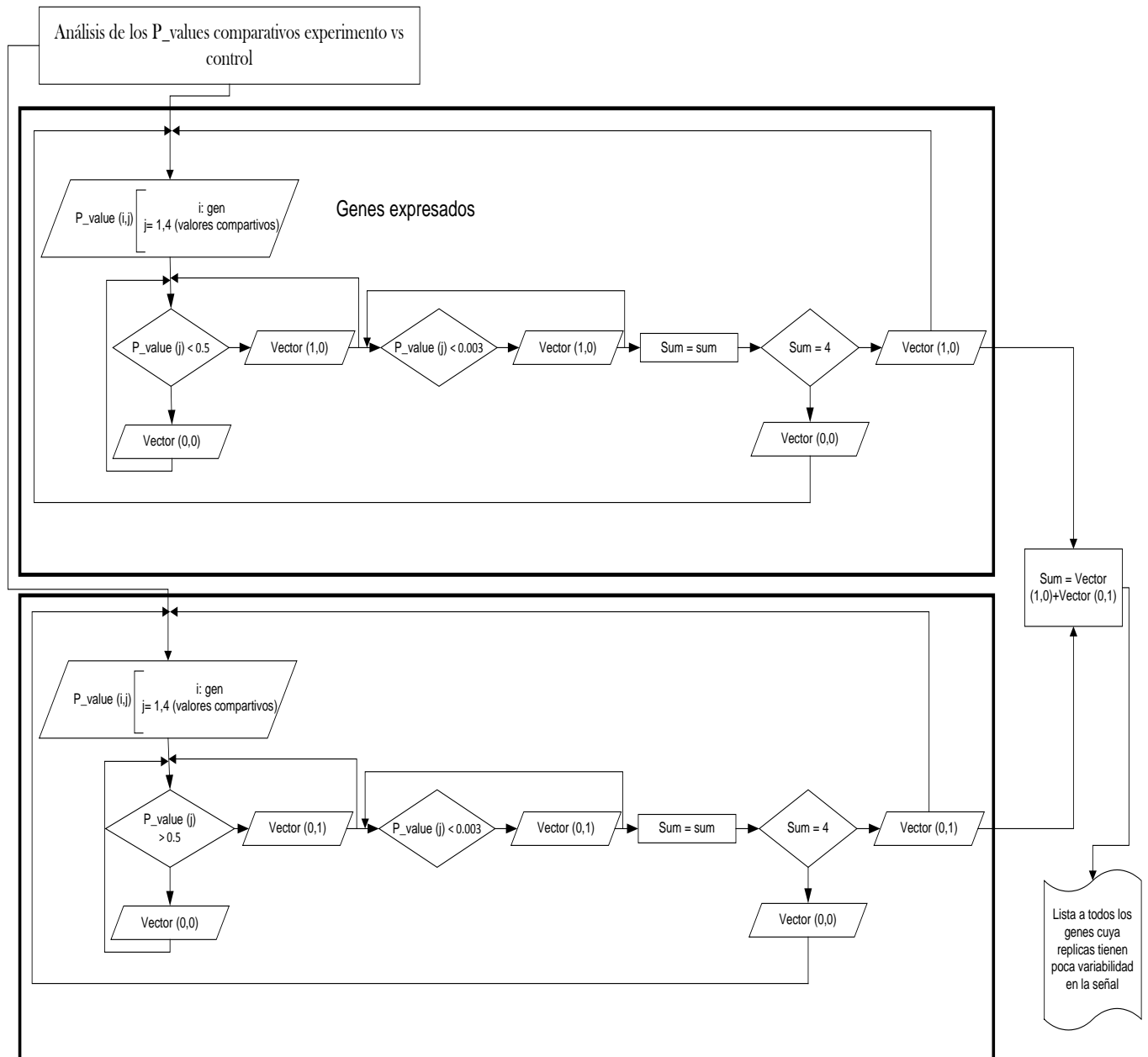
ANEXO A

Diagrama de flujo del algoritmo para determinar la lista los genes que tienen poca variabilidad en la señal



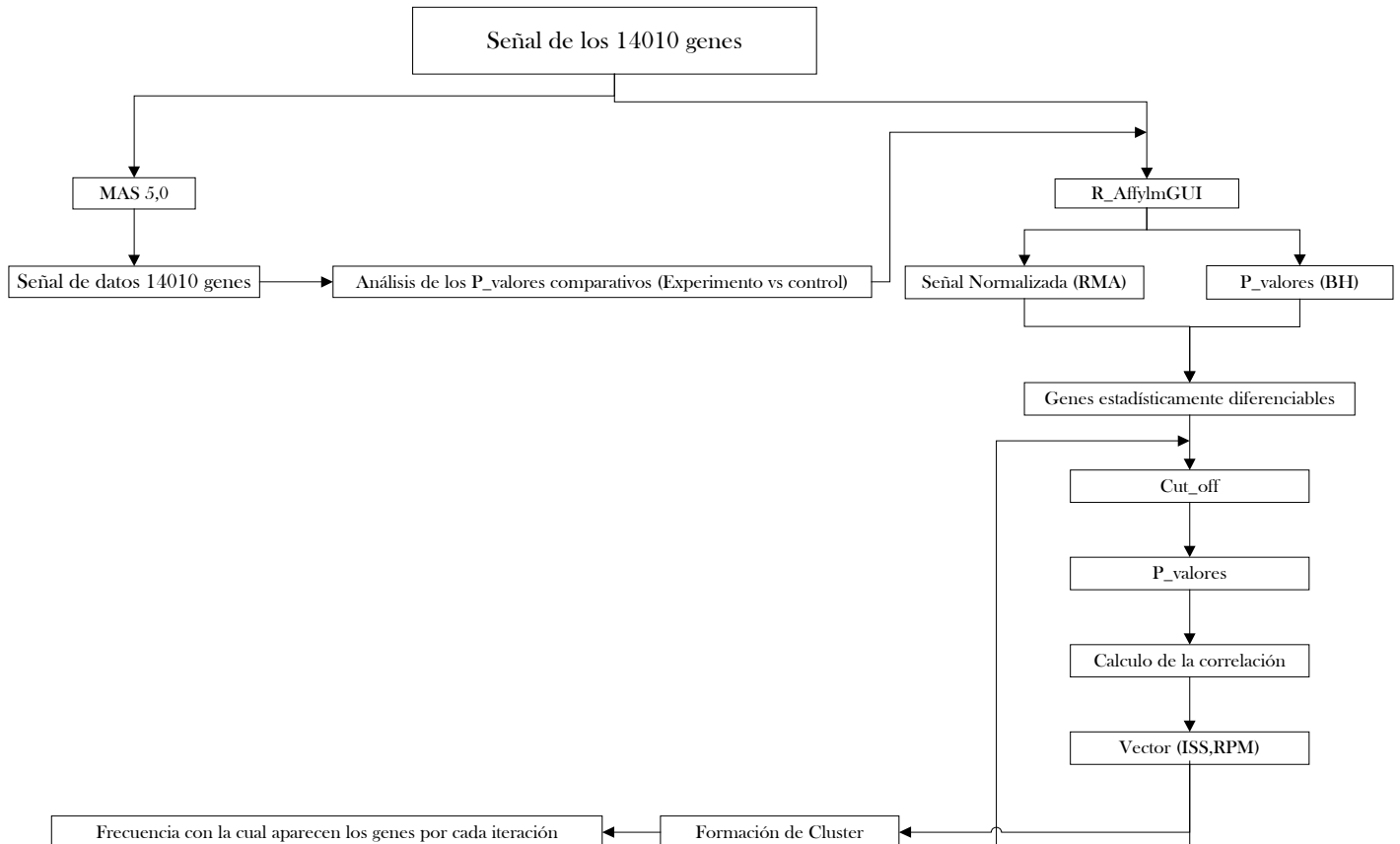
ANEXO B

Diagrama de flujo del algoritmo para determinar la lista de genes que tienen poca variabilidad en la señal al comprar el grupo experimental vs el grupo control



ANEXO C

Diagrama de flujo del algoritmo del método de correlación



ANEXO D

PUBLICACIONES

Raúl Herranz, Alberto Benguría, David A. Laván, Irene López-Vidriero, Gilbert Gasset, F. Javier Medina, Jack J. W. A. Van Loon, and Roberto Marco. "Spaceflight-related suboptimal conditions can accentuate the altered gravity response of Drosophila transcriptome". Molecular Ecology. Volume.: 19 pp (4255 - 42664). 31/108/2010.

Raúl Herranz, David A. Laván, F. Javier Medina, Jack J. W. A. van Loon and Roberto Marco. "Drosophila Gen Experiment in the Spanish Soyuz Mission to the ISS: II Effects of the Containment Constraints" Microgravity Science and Technology. Volume 21 pp (299 - 304) 04/11/2009. Netherlands

Herranz, R. Lavan, D.A. Benguria, A. Duque, P. Leandro, L.J. Gasset, G. Medina, F.J. van Loon, J. Marco, R. "Gene" Experiment in the Spanish Soyuz Mission to the ISS. Effects of the cold transportation step". Microgravity Science and Technology. Volume: 19 pp (196 - 200) 2007. Netherlands

L.J. Leandro, N.J. Szewczyk, A. Benguría, R. Herranz, D. Laván, F.J. Medina, G. Gasset, J. van Loon, C.A. Conley and R. Marco. "Comparative analysis of Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans gene expression experiments in the European Soyuz flights to the International Space Station" Advances in Space Research.

Spaceflight-related suboptimal conditions can accentuate the altered gravity response of *Drosophila* transcriptome

RAUL HERRANZ,*† ALBERTO BENGURÍA,‡§ DAVID A. LAVÁN,* IRENE LÓPEZ-VIDRIERO,‡ GILBERT GASSET,¶ F. JAVIER MEDINA,† JACK J. W. A. VAN LOON** and ROBERTO MARCO*¹

*Departamento de Bioquímica & Instituto de Investigaciones Biomédicas 'Alberto Sols' (UAM-CSIC), C/Arzobispo Morcillo, 4 Madrid, 28029 Spain, †Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, E-28040, Madrid, Spain, ‡Centro Nacional de Biotecnología (UAM-CSIC), Madrid, Spain, §Genomics Unit. Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, C/Melchor Fernández Almagro, 3. Madrid, Spain, ¶GSBMS, Université Paul Sabatier, Toulouse, France, **Dutch Experiment Support Center, DESC at OCB-ACTA, VU-University and Univ. of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands

Abstract

Genome-wide transcriptional profiling shows that reducing gravity levels during *Drosophila* metamorphosis in the International Space Station (ISS) causes important alterations in gene expression: a large set of differentially expressed genes (DEGs) are observed compared to 1g controls. However, the preparation procedures for spaceflight and the nonideal environmental conditions on board the ISS subject the organisms to additional environmental stresses that demonstrably affect gene expression. Simulated microgravity experiments performed on the ground, under ideal conditions for the flies, using the random position machine (RPM), show much more subtle effects on gene expression. However, when the ground experiments are repeated under conditions designed to reproduce the additional environmental stresses imposed by spaceflight procedures, 79% of the DEGs detected in the ISS are reproduced by the RPM experiment. Gene ontology analysis of them shows they are genes that affect respiratory activity, developmental processes and stress-related changes. Here, we analyse the effects of microgravity on gene expression in relation to the environmental stresses imposed by spaceflight. Analysis using 'gene expression dynamics inspector' (GEDI) self-organizing maps reveals a subtle response of the transcriptome to microgravity. Remarkably, hypergravity simulation induces similar response of the transcriptome, but in the opposite direction, i.e. the genes promoted under microgravity are usually suppressed under hypergravity. These results suggest that the transcriptome is finely tuned to normal gravity and that microgravity, together with environmental constraints associated with space experiments, can have profound effects on gene expression.

Keywords: development and evolution, *Drosophila*, ISS, metamorphosis, microgravity, RPM

Received 16 December 2009; revision received 19 May 2010; accepted 21 May 2010

Introduction

How biological organisms detect the force of gravity, and adapt their molecular systems, particularly their transcriptomes, to it, is still unclear. These are key questions for fundamental biology; understanding the mech-

anisms through which gravity influences biological organisms is critical for maintaining the health of astronauts and other organisms during extended periods in space and for eventual colonization of nearby satellites and planets as part of life-support systems. During the past few decades, biological research related to environmental conditions found in space has proceeded at a steady pace (Brinckmann 2007; Clément & Slenzka 2006; Häder *et al.* 2006; Marthy 2003; Moore *et al.* 1996). Despite this, the genetic effect of the space environment on different biological models remains inconclusive.

Correspondence: Raul Herranz, Fax: +34 91 536 04 32;

E-mail: rherranz@cib.csic.es; raul.herranz@uam.es.

¹Our colleague and friend Professor Roberto Marco passed away June 27th, 2008. This paper, his last contribution to Space Biology, is affectionately dedicated to his memory.

Attempts to analyse the overall transcriptome response have been performed in some species, revealing modest effects (Selch *et al.* 2008), but until this study, none have focused on insects.

Two experimental approaches can be used to evaluate the effects of altered gravity. The first of these is reducing six orders of magnitude the force of gravity by performing the experiments on board e.g. the International Space Station (ISS). The ISS offers improved facilities to carry out longer duration experiments than previously possible. However, access to the ISS is problematic, expensive and scientifically constrained. A consequence of this was the implementation by the European Space Agency (ESA) of the 'European Soyuz Missions to the ISS' initiative. The science performed during these Missions was reviewed in a Meeting held in Toledo, Spain, June 2006 (van Loon *et al.* 2007). One of the experiments included was the GENE experiment, devoted to the analysis of the whole-genome transcriptional profile of *Drosophila* when pupal development is carried in microgravity (ISS).

The second approach is to simulate microgravity conditions on ground by 'neutralizing' the gravity vector (Hoson *et al.* 1992). One way to do this is by rotating the sample using a horizontal (two-dimensional) clinostat of the type extensively used in plant physiology analysis. Here, we use a three-dimensional analogue of the clinostat, the 'random positioning machine' (RPM), to simulate microgravity. By continuously changing the direction of the gravitational force with respect to the sample, the *time-averaged* gravitational force vector on the organism can be reduced to zero over a period shorter than the response time of the gravisensing mechanism under investigation. This system is particularly interesting for animal model systems in which the samples can be not located in a single axis. Several experiments using isolated cell and tissue culture systems of the type found modified in space experiments have shown previously that the RPM is the ground simulator that most faithfully reproduces the effects of microgravity on various biological systems (Borst & van Loon 2009; van Loon 2007).

Here, we analyse the results of the GENE experiment performed in the ISS during the 'Cervantes' Soyuz mission. We compare the data with experiments performed in ground facilities, under ideal conditions and under conditions designed to mimic the additional stresses on the organisms imposed by spaceflight procedures. The most important of them are transportation at 14 °C to the launching site, amount of oxygen in hermetically sealed containers and uncontrollable temperatures and timings during launching and landing of the experiments. We refer to these constrained experimental conditions at transport, launch and during the mission as

'space constraints'. More detailed information is given in the Data S1, Figure S2, S3 and S4.

The main, and novel, conclusions from this work are that exposure to real microgravity, together with the additional stresses introduced by space flight produces, shows extensive changes in gene expression patterns during *Drosophila* pupal life. Similar responses are observed in ground-simulated microgravity when the same constraints found in space experiments are used. An integrative analysis of the microarray data shows that microgravity alone, without space constraints, produces a very subtle response of the transcriptome. We have also found that hypergravity produces similar subtle effects on the transcriptome but in the opposite direction.

Materials and methods

Experiments profile

Four experiments have been included in this study. Two of them have been performed under the environmental conditions imposed by a Soyuz Mission to the ISS (see Data S1 for a detailed description), and the other two have been performed under ideal laboratory conditions. Figure 1 describes the precise timings of the operations and environmental conditions in the ISS-constrained experiment (real microgravity), the RPM-constrained experiment (simulated microgravity) and the non-constrained experiments [both simulated microgravity (RPMnc) and hypergravity (10g nc) were performed with a common design].

Biological materials

We investigated the effect of microgravity on the pupal lifetime of *Drosophila* (Oregon R Strain). Although the influence of microgravity on other developmental stages can also be investigated, the limitations of performing space experiments limited the analysis of these additional stages.

Completion of *Drosophila* pupal development takes around 4 days at room temperature. It was thus necessary to slow pupal development so that, in addition to the time required for transport (at least 3 days at 14 °C), the pupae could be subjected to space conditions for up to 3.5 days at 21 °C, without them developing into the adult stage (Herranz *et al.* 2007, 2009).

Hardware description

Constrained experiment samples were installed in a modified hermetical experiment box (ESA Type I container) and exposed to the expected temperature profile of the Soyuz Mission (Figs 1 and S1), preventing the

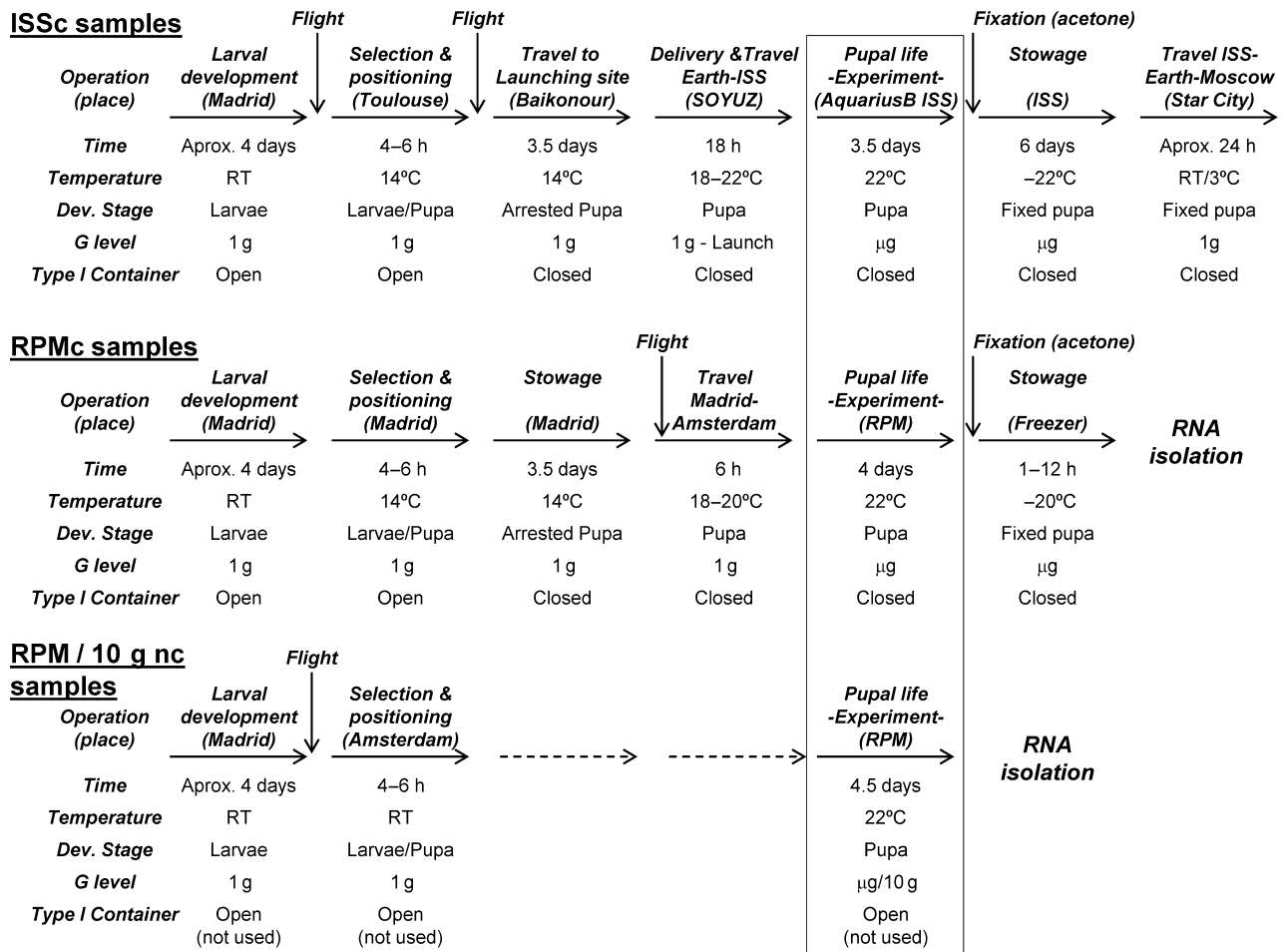


Fig. 1 Detailed description of the experiments profile. Operations performed in the four experiments including preparation, transportation, exposure to altered gravity and recovery of the samples are described together with the environmental parameters (duration, temperature, effective g level and containment) in each step are described. Note that the non-constrained experiments have been performed with a simple and common design in comparison with the space mission timeline (Herranz *et al.* 2005). Because pupation life development is almost arrested, we consider that the possible effects of these 3.5 days living on 1g conditions should not have a major impact in the later 3.5 days on microgravity at 22 °C and is comparable to the 4.5 days of pupal life at 22 °C in non-constrained conditions.

imagoes from hatching before the experiment could be terminated. In combination with cold treatment, a MAMBA Type-I container system was used to fix/preserve the samples in acetone during the flight. Non-constrained experiments were performed without the Type I container. In all cases, recent *Drosophila* pupae were placed on filter paper and introduced to a berlingot (air-permeable plastic bag) containing acetone ampoules. Additional information on the experimental apparatus used during spaceflight and the experimental constraints can be found in the Data S1.

RNA and microarray analyses

Two batches of 20 pupae were flown on the ISS, and two batches of 20 pupae were used as 1-day delayed

ground controls (to follow the ISS environmental conditions). RNA was prepared from the pooled pupae of each batch and were processed using Affymetrix *Drosophila* (DrosophilaGenome1) chips covering 73% of the fly coding genome. In RPM and centrifuge experiments, the 1g ground controls were prepared simultaneously to the experiments and kept in the same environmental conditions. Only replica samples that passed the normal quality tests of the extracted RNA were used for the microarray analysis [a third microarray from a sample exposed to the ISS has been submitted to the database but not included in this analysis because of its lesser quality and inconsistency with the other two ISS arrays, see Fig. S5A (Herranz *et al.* 2005)]. Quantitative RT-PCRs of a subset of genes confirmed the validity of the microarray-generated data (Fig. 2b). Microarray

analysis was performed using the affyGUI R Package from Bioconductor and the MAS 5.0 algorithm from Affymetrix (Gentleman *et al.* 2004). Clustering analysis was performed with gene expression dynamics inspector (GEDI) clustering software default parameters (Eichler *et al.* 2003). The GEDI approach was used because, unlike 'traditional' clustering algorithms, it captures in a 2D diagram the complexity of the whole transcriptome. Thus, the genome-wide response to altered gravity can be easily inspected visually. Additional information on the methods used in the data analysis can be found in the Data S1.

Results

Real or simulated microgravity, together with spaceflight constraints, has dramatic effects on the gene expression pattern during Drosophila pupal development

RNAs from samples exposed to real (ISS) or simulated microgravity on ground (RPM), during the 4-day metamorphosis phase of the *Drosophila*, were labelled and hybridized to Affymetrix *Drosophila* genome arrays (14,000 probe-sets interrogating more than 13,500 genes) and compared to 1g controls. Note that we used data on environmental conditions operating during the ISS experiment to apply exactly the same environmental stresses in (i) the RPM experiment and (ii) the 1g controls for both the ISS experiment and the RPM ground experiment. Thus, in both experiments, the loss of the effects of gravity was accompanied by the same environmental stresses, and in each case, the effects of these stresses were controlled for by the appropriate treatment of the controls. Any differences in gene expression detected should therefore reflect only the effects of real or simulated alteration of the gravitational parameter. We have detected important alterations in gene expression (Fig. 2a). A large set of statistically significant differentially expressed genes (DEGs), [false discovery rate (FDR) <0.05 and fold change >2], were detected, including 240/658 downregulated and 228/302 upregulated genes in ISS/RPM. Interestingly, 79% of the DEGs detected in the ISS are also detected in the RPM experiment (Fig. 2a). The expression levels of some of these genes were validated by quantitative real-time PCR (Fig. 2b, upper panel). The correspondence between the values reported in the microarrays and those obtained in the qPCR assay is sufficient in most of the cases, although the microarray-derived expression changes seem to be a little overestimated when compared to those obtained from qPCR. Furthermore, qPCR experiments were performed on 17 genes already described as involved in gravisensing (Armstrong *et al.* 2006) but

not included in Affymetrix genome 1.0 arrays. Taking a two fold cut-off, almost all these genes (15 of the 17) change their expression values in the ISS and/or in the RPM compared to respective 1g controls. All the genes that showed significant variations in their expression levels using this criterion responded in the same way, i.e. decreasing in comparison with control (Fig. 2B, lower panel).

The remarkable correspondence of the ISS and RPM effect can be seen from our analysis of all 6332 genes with signals classified as present in all conditions by Affymetrix MAS 5 algorithm. Figure 3a shows a plot of the signal changes for these genes expressed as average log₂ ratios, that is, the ratio of their average experimental and controls signals (expressed as base 2 logarithms) after appropriate corrections based on microarray controls and different microarray replicates. Most of the genes responded in a similar way (increasing or decreasing in parallel) to both conditions ($r > 0.79$). This correlation, already highly significant as a consequence of the large number of genes plotted, was even higher when a >two fold change filter is applied ($r > 0.9$ when grey dots are discarded by a cut-off ratio of 2 in Fig. 3a). The significance of the correlation in all cases was $P < 0.001$. As a consequence, very few genes are found in the 2nd and 4th quadrants, especially when the more stringent criteria are used (Fig. 3a, b). Furthermore, the strong correlation between the two experimental conditions justifies performing a Gene ontology analysis of the overlapping DEGs. This analysis shows that upregulated genes are mainly associated with mitochondrial respiratory activity, while repressed genes are associated with developmental processes and stress responses (see Table S1).

Micro- or hypergravity, in the absence of the spaceflight-related constraints, have subtle and opposite effects on the transcriptome response

A repetition of the experiment but without using the space experiment containers and the 14 °C cold treatment (i.e. the transport step) was performed using the RPM. The number of genes that responded to the simulated microgravity conditions was seriously reduced, and only five DEGs were detected (FDR <0.05 fold change >2). Moreover, only one gene without known molecular function (CG13678) was common to DEGs previously found at the ISS and the RPM with space constraints. However, there is also a correlation between the genes of pupae exposed to RPM treatment with and without cold transport (data not shown), albeit with a lower correlation coefficient. A question that immediately follows is how specific is the response to microgravity? As a first attempt to answer this

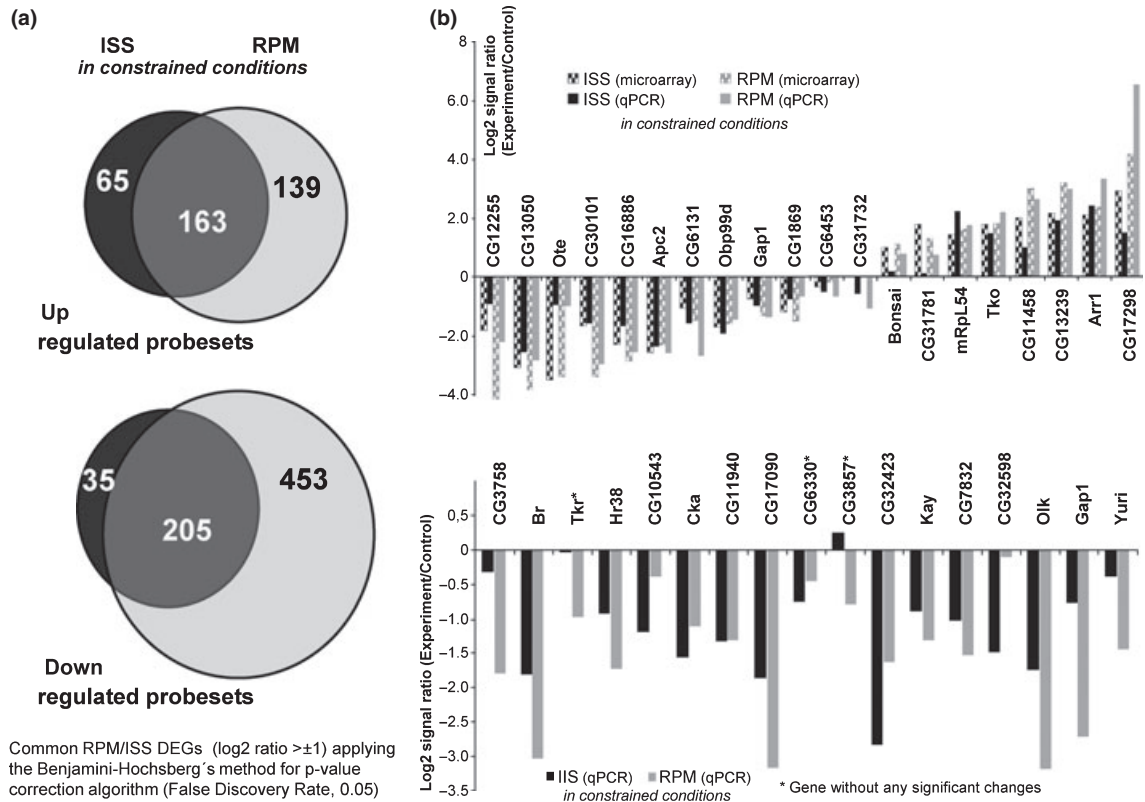


Fig. 2 Differentially expressed genes (DEGs) in the constrained experiments on microgravity [International Space Station (ISS) and random position machine (RPM)]. (a) Venn diagrams of overlapping DEGs in ISS and RPM constrained experiments detected by Affymetrix microarrays. Interestingly, 79% of the DEGs detected in the ISS are also detected in the RPM experiment. (b) RT-PCR validation data. In the upper panel, 20 genes corresponding to all the groups of conditions and to different levels of expression by microarray analysis (chip) were selected and quantitative RT-PCR assays (qPCR) were conducted as indicated. The analysed genes are shown from the most downregulated (left) to the most upregulated (right). In the lower panel, some previously identified (Armstrong *et al.* 2006) gravitaxis genes absent in the Affymetrix genome array expression levels have been determined by quantitative RT-PCR. In both cases, (ISS/RPM) the values are compared to the controls including the cold transport.

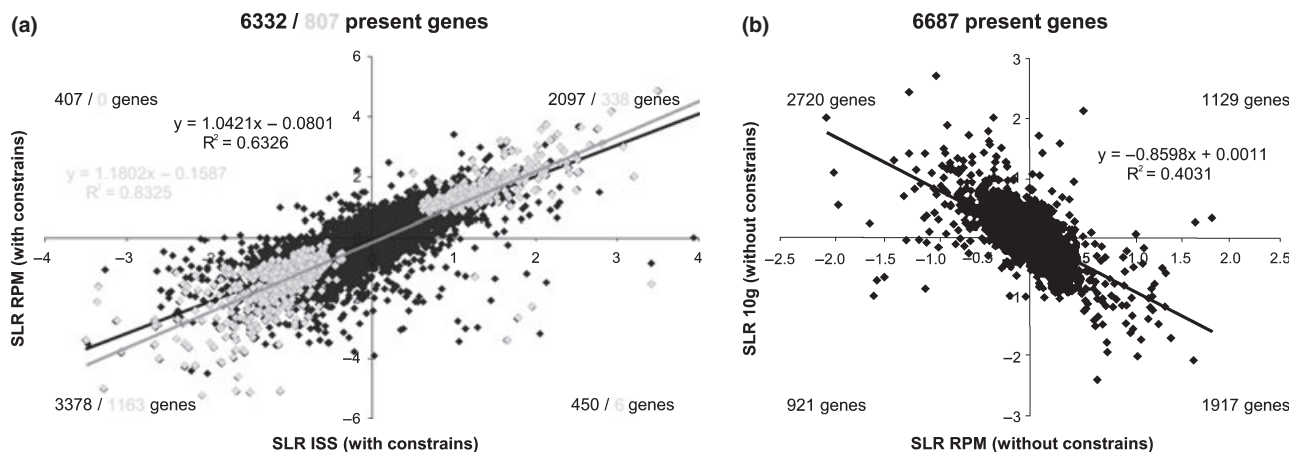


Fig. 3 Genome-scale correlations of microarrays expression values in terms of signal log₂ratios (SLR) changes. In plot a, the International Space Station and the random position machine (RPM) including constraints, when all the 6332 present genes are included, show consistent signals in the microarray; the correlation $r > 0.79$ remains significant at $P < 0.001$. Grey dots are remaining genes when a 1.5 fold filter is applied and the correlation is increased to $r > 0.91$ with $P < 0.001$. In Plot b, an opposite correlation is shown in all genes expression present (MAS5) affected in the RPM compared to the effects of the hypergravity treatment, both without experimental constraints.

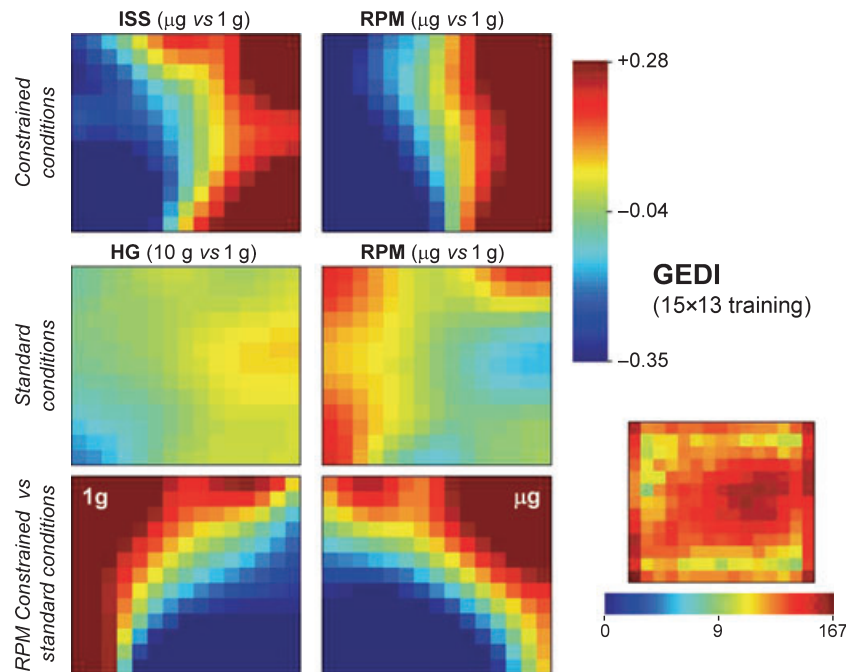


Fig. 4 Gene expression dynamics inspector 15×13 clustering analysis based on the four altered gravity experiments. The up-right colour scale indicates the average \log_2 ratios level of each cluster in the four conditions compared to the parallel 1g control (first and second row) or the constrained vs. non-constrained control (third row). Experiments in constrained conditions [International Space Station, mg real microgravity and random position machine (RPM), mg simulated microgravity] are shown in the first row, and experiments under standard condition (HG, 10g hypergravity and RPM, mg simulated microgravity) are shown in the second row. The down-right panel indicates the number of probe-sets (10995 probe-sets) included in each cluster (15×13 clusters), following its own colour scale at the bottom.

question, a group of pupae were exposed to 10g in a dedicated MidiCAR centrifuge in the absence of the ISS experiment constraints. When compared to 1g controls, no DEGs were detected in this set of samples, using the same statistical filters as in the other experiments ($FDR < 0.05$ fold change > 2). These results indicate that, in the absence of space constraints, a response of the transcriptome to changes in the gravity vector is very subtle. Interestingly, a comparison of the average \log_2 ratios of genes marked as 'Present' using Affymetrix MAS 5 algorithm, obtained in the unconstrained RPM (simulated microgravity) and hypergravity (10g) experiments, showed a clear negative correlation (Fig. 3B). This result suggests that, although subtle, the transcriptome has a coordinated response to changes in the gravity vector.

To study these coordinated effects in more detail, we decided to use a new tool used to display the status of the whole genome as a single picture, enabling us to readily identify differences between alternate states of the same genome. We analysed the microarray data with the user-friendly and freely downloadable GEDI program (Eichler *et al.* 2003). GEDI is a 'self-organizing map'-based software package that allows the visualization of gene expression patterns in mosaics of $n \times m$

tiles. Each tile corresponds to a cluster of genes (with a variable size as indicated in the density map at Fig. 4 right bottom panel) that behaves similarly across conditions (centroid). Different colours in the comparison panels reflect the expression intensity of a centroid in each condition (in our case, the average \log_2 ratio of expression signal intensities as detected with the microarrays scanner between experimental and control condition). Additionally, GEDI places similar centroids close to each other in the mosaic, creating an image of the transcriptome and allowing its analysis as an entity by simple visualization and through different conditions. For this analysis, we first filtered out probe-sets with very low signal across the different conditions (probably not expressed or not reliably detected probe-sets). Almost 11,000 probe-sets were finally used for GEDI analysis. They were placed in 15×13 mosaics with an average of 56 genes per centroid (Fig. 4).

As expected, the transcriptome responds dramatically to real microgravity in ISS or RPM under constrained conditions (ISS and RPM panels in the first row in Fig. 4). In both cases, the response is similar, although with some differences, as clearly shown in the GEDI mosaics and already observed in the first analysis (Fig. 2). However, simulated microgravity alone (RPM)

has a different and small effect on the transcriptome (see the colour scale of the log₂ expression level ratios). Strikingly, a similar although inverted pattern is obtained in hypergravity (HG), suggesting that the transcriptome senses and responds coordinately to changes in the gravity vector (Fig. 4, second row panels). Interestingly, the pattern in the constrained and non-constrained RPM experiments is not comparable, pointing to an important effect of the environmental constraints in the transcriptome sensibility to the change in the gravitational stimulus. This point is also evident in the RPM interexperiment comparisons (constrained vs. not constrained conditions, third row in Figs 4 and S5) highlighting the differential gene expression pattern associated with temperature/oxygenation factors (third row panels) and the gravitational factor in both constrained and standard conditions. These results also suggest that the transcriptome is finely tuned to normal gravity and that the synergic effect on the transcriptome of suboptimal conditions during spaceflight plus the microgravity condition may be explained by this 'out of tune' state of the transcriptome in microgravity.

Discussion

Genome-scale or Gene-specific response?

Our hypothesis was that a relatively small group of gravity-responding genes would be found, as had been identified in simpler unicellular systems (Wilson *et al.* 2002). However, our results show that, in this case in which the samples were fixed on orbit, the pattern of gene response is more complex. It is clear from the analysis of the data presented that, in flight suboptimal conditions, many genes included in the Affymetrix *Drosophila* genome-1 chips respond to changes in the gravity vector. Furthermore, even genes not included in this chip, e.g. the ones described by the group of Beckingham (Armstrong *et al.* 2006) involving geotactic behaviour of *Drosophila* when mutated, are among the genes altered in our experiments assayed by qPCR (Fig. 2B lower panel). Using the stringent statistical methods recommended for this kind of microarray results analyses, we have not been able to find significant DEGs in the non-constrained experiments, so a gene-specific response seems not to be the case, except in the constrained conditions in which a collection of genes and ontologies have been found (Table S1). Despite this, we have found that the enhanced response observed under suboptimal conditions is correlated with a subtle response under ideal conditions in simulated microgravity and hypergravity. Consequently, the same groups of genes also respond in ideal laboratory conditions but not enough to be detected as statistically significant DEGs.

We have looked for genes showing a two fold change in expression in three of the five analysed conditions (including, as a fifth condition, the pooled analysis of the constrained experiments). Only 43 candidate genes meet this requirement. Using Pathway Studio software, we have obtained a pathway that links almost all these genes, using a total of only 91 entities (shown in Fig. S6 and Table S2). This analysis is coherent with Fig. 4, reflecting the higher effect in the constrained experiments (multiple genes with a log change in expression of ± 4) in comparison with the laboratory conditions and also a number of genes that behaves opposite in micro- and hypergravity-simulated conditions.

Regarding how these genes are related and how some functions can be affected by the different altered-gravity conditions, the most consistent finding is an ecdysone-induced response that can be related with the developmental rate in microgravity; this fact has been pointed out in the past (Vernos *et al.* 1989). It is worth noticing that some ecdysone-induced genes behave in a different way in different experiments but are generally affected in all of them. This change, which was evident in the non-constrained experiments and stronger in the constrained experiments (maybe owing to the container constraints), was even stronger in the real microgravity samples. Other components present in Fig. S6, like heat-shock proteins, external stimuli sensors and assembly machinery, seem to be related with a coordinated response of the organism under an undefined stress condition (microgravity is a stimulus that has never been experienced during biological evolution), affecting the cell cycle and proliferation indirectly. For instance, some ribosome-related proteins have appeared in the network, although their gene expression levels were initially not considered relevant (rps10b, rps26, rpl7a). It is interesting to notice that other model systems exposed to simulated microgravity, like *Arabidopsis thaliana*, show a different phosphorylation pattern of stress-related proteins (Barjaktarovic *et al.* 2009). In *Drosophila*, Hsp70 seems to be a mediator of the ageing-protective effect induced by mild hypergravity (Le Bourg *et al.* 2002), a relation also highlighted in mammals (Nichols *et al.* 2006; van Loon *et al.* 2005). A preliminary genome-scale analysis of spaceflight response in nematodes (Selch *et al.* 2008) has also detected stress links, though this is the first time that microgravity conditions are related with a genome-scale stress-related response in *Drosophila*. In addition, a relation about ecdysone and stress, particularly being a protector against the oxidative stress, has been reported in the literature, and it is evident in Fig. S6 (Radyuk *et al.* 2009; Roesijadi *et al.* 2007). Although this effect could have been amplified by the flight container constraints, it is also noticeable in non-constrained experiments. Thus,

we have to conclude that ecdysone-regulated systems are extremely sensitive to environmental changes, including altered gravitational force.

An evolutionary explanation under this complexity

Several spaceflight experiments have been performed to establish whether animal development can proceed normally in microgravity (Marco *et al.* 1986; Marthy 2003; Moore *et al.* 1996; Ubbels *et al.* 1994; Vernos *et al.* 1989). These studies reached what can be considered paradoxical conclusions. It has been repeatedly found that isolated cells in culture can sense the absence of such a weak force as gravity and modify important cellular parameters such as their cytoskeleton organization, signal transduction responses and proliferation rates. (Boonyaratanakornkit *et al.* 2005; Nichols *et al.* 2006; Rosner *et al.* 2006; Vassy *et al.* 2001). Despite these changes at the cellular level, developmental systems seem able to develop normally in space, even though the processes altered at single cell and tissue levels are major players in developmental processes (Marco *et al.* 1996; Morey-Holton *et al.* 2007; Ubbels *et al.* 1994). Gene redundancy, the robustness of biological networks, the old concept of developmental regulation, among others, are all pieces of the puzzle that current efforts in biological research are trying to untangle. Gravity is such a basic parameter detected at the cellular level (Hemmersbach & Hader 1999; Loesberg *et al.* 2007; Nickerson *et al.* 2004; van Loon *et al.* 2009) that the great majority of genes show an altered expression value although small when this fundamental physical condition is modified. It will be interesting to monitor how this gene expression profile tuning changes as successive generations of *Drosophila* are exposed to altered gravity conditions in long-term experiments. This general gene response is the background on which evolutionary changes may be operating during evolution (Waddington 1961). In fact, some environmental stress-detecting genes that have been modelled by evolution (Williams & Sokolowski 2009) like have also been detected in our analysis.

Some treatments imposed on the experiment by the mission constraints, such as the cold transport step and the oxygen limitation in the sealed containers, although compatible with *Drosophila* pupal development, synergistically affected the response to microgravity exposure, both real and simulated. It is highly likely that such combined sometimes synergistic effects could open the way to understanding how the gene expression patterns and the actual phenotypes can adjust to the environment. The synergistic amplification by environmental conditions on the gene expression profiles could be related to the essentiality of genes on the phenotypic

properties of the systems. Using far from optimal conditions may allow the detection of effects of specific environmental parameters that, by themselves and under normal laboratory conditions, seem to be relatively harmless or have little effect on our model system (Herranz *et al.* 2009). In terms of space travel planning, the side effect of microgravity may be reducing to a minimum if we do not combine weightlessness with another environmental stresses.

Future studies should extend these findings. The availability of better instrumentation on the ISS, especially now that the European Columbus and the Japanese Kibo modules have been launched and installed, will allow repeating and extending these experiments both in time and intensity. In the meantime, the appropriateness and convenience of using ground microgravity simulation facilities is confirmed by this study, whose conclusions have to be considered preliminary because of the limited number of samples that could be analysed from a single ISS mission. Future experiments, including gravity levels different from those used here, will identify the low and high gravity thresholds for these overall genome effects and confirm whether a key set of gravity-affected genes can be identified and the phenotypic consequences of their modified expression. In addition, it is important to test any particular constraints that, for different reasons, are to be included in space experiments. The approach should maximize the use of ground simulation facilities in the initial optimization and design of critical and more expensive experiments in space that will seek to confirm and refine the initial conclusions gathered on ground.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Spanish Space Program in the 'Plan Nacional de Investigacion Cientifica y Desarrollo Tecnológico' [ESP2001-4522-PE and ESP2006-13600-C02-01 to Marco. and ESP2006-13600-C02-02 to Medina.] and the Dutch NWO-ALW-SRON grant [MG-057 to van Loon]. R. Herranz during the Cervantes mission and D. Lavan during the post-flight analysis were supported by Spanish Ministerio de Educacion y Ciencia within the FPI fellowship program. We also like to recognize the European and Russian space agencies for supporting our experiment during the Cervantes Soyuz mission, particularly to the skilful work of the ESA astronaut Pedro Duque in the ISS. We also thank Mrs. Aida Villa (IIB-UAM, Madrid, Spain) and Mrs. Brigitte Eche (GSBMS-CNES, Toulouse, France) for excellent technical assistance in the ground experiments. The supply of MAMBA is acknowledged to Dutch Space B.V. (Leiden, The Netherlands). The ESA personnel at ESTEC (Noordwijk, The Netherlands) were of great help in the preparation of the ISS Mission; in particular, we thank Mr. Jesús Jiménez, Ms. Natalie Pottier and Mr. Fabrizio Festa, as well as Dr. Didier Chaput (CNES, Toulouse, France). Last but not least, we want to express our gratitude to Prof.

Ebberhard Horn, Prof. John Sparrow, Prof. Rob Knight, Dr. Richard Hill and the anonymous referees for their helpful and inspiring review of this article manuscript.

References

- Armstrong JD, Texada MJ, Munjaal R, Baker DA, Beckingham KM (2006) Gravitaxis in *Drosophila melanogaster*: a forward genetic screen. *Genes, brain, and behavior*, **5**, 222–239.
- Barjaktarovic Z, Schutz W, Madlung J, Fladerer C, Nordheim A, Hampf R (2009) Changes in the effective gravitational field strength affect the state of phosphorylation of stress-related proteins in callus cultures of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, **60**, 779–789.
- Boonyaratnakornkit JB, Cogoli A, Li CF *et al.* (2005) Key gravity-sensitive signaling pathways drive T cell activation. *FASEB Journal*, **19**, 2020–2022.
- Borst AG, van Loon JJWA (2009) Technology and developments for the random positioning machine, RPM. *Microgravity science and technology*, **21**, 287–292.
- Brinckmann E (2007) *Biology in Space and Life on Earth*. Wiley, Weinheim, Germany.
- Clément G, Slenzka K (2006) *Fundamentals of Space Biology: Research on Cells, Animals and Plants in Space*. Springer, New York.
- Eichler GS, Huang S, Ingber DE (2003) Gene Expression Dynamics Inspector (GEDI): for integrative analysis of expression profiles. *Bioinformatics*, **19**, 2321–2322.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM *et al.* (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology*, **5**, R80.
- Häder DP, Hemmersbach R, Lebert M (2006) *Gravity and the Behavior of Unicellular Organisms*. Cambridge University Press, New York, NY.
- Hemmersbach R, Häder DP (1999) Gravitoresponses of certain ciliates and flagellates. *FASEB Journal*, **13**(Suppl.), S69–S75.
- Herranz R, Benguria A, Fernández-Pineda E *et al.* (2005) Gene expression variations during *drosophila* metamorphosis in space. The GENE experiment in the Spanish cervantes mission to the ISS. *Journal of gravitational physiology*, **12**, 253–254.
- Herranz R, Laván D, Benguría A *et al.* (2007) The “Gene” experiment in the Spanish Soyuz Mission to the International Space Station. Effects of cold transportation. *Microgravity science and technology*, **19**, 196–200.
- Herranz R, Laván DA, Medina FJ, van Loon JJ, Marco R (2009) The “Gene” Experiment in the Spanish Soyuz Mission to the International Space Station. II. Effects of oxygen concentration constrain. *Microgravity science and technology*, **21**, 299–304.
- Hoson T, Kamisaka S, Masuda Y, Yamashita M (1992) Changes in plant growth processes under microgravity conditions simulated by a three-dimensional clinostat. *Journal of Plant Research*, **105**, 53–70.
- Le Bourg E, Valenti P, Payre F (2002) Lack of hypergravity-associated longevity extension in *Drosophila melanogaster* flies overexpressing hsp70. *Biogerontology*, **3**, 355–364.
- Loesberg WA, Walboomers XF, Bronkhorst EM, van Loon JJ, Jansen JA (2007) The effect of combined simulated microgravity and microgrooved surface topography on fibroblasts. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **64**, 174–185.
- van Loon JJWA (2007) Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research. *Advances in Space Research*, **39**, 1161–1165.
- van Loon JJWA, Tanck E, van Nieuwenhoven FA, Snoeckx LHEH, de Jong HAA, Wubbels RJ (2005) A brief overview of animal hypergravity studies. *Journal of gravitational physiology*, **12**, 5–10.
- van Loon JJ, Medina FJ, Marco R (2007) The national - esa soyuz missions andromède, marco polo, odissea, cervantes, delta and eneide. *Microgravity science and technology*, **19**, 9–32.
- van Loon JJ, van Laar MC, Korterik JP *et al.* (2009) An atomic force microscope operating at hypergravity for in situ measurement of cellular mechano-response. *Journal of Microscopy*, **233**, 234–243.
- Marco R, Vernos I, Gonzalez J, Calleja M (1986) Embryogenesis and aging of *Drosophila melanogaster* flown in the space shuttle. Preliminary analysis of experiment fly 15E. *Naturwissenschaften*, **73**: 431–432.
- Marco R, Benguria A, Sanchez J, de Juan E (1996) Effects of the space environment on *Drosophila melanogaster* development. Implications of the IML-2 experiment. *Journal of Biotechnology*, **47**, 179–189.
- Marthy HJ (2003) *Developmental Biology Research in Space*. Elsevier, Amsterdam.
- Moore D, Bier P, Oser H (1996) *Biological and Medical Research in Space: An Overview of Life Sciences Research in Microgravity*. Springer-Verlag, Berlin.
- Morey-Holton ER, Hill EL, Souza KA (2007) Animals and spaceflight: from survival to understanding. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, **7**, 17–25.
- Nichols HL, Zhang N, Wen X (2006) Proteomics and genomics of microgravity. *Physiological Genomics*, **26**, 163–171.
- Nickerson CA, Ott CM, Wilson JW, Ramamurthy R, Pierson DL (2004) Microbial responses to microgravity and other low-shear environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **68**, 345–361.
- Radyuk SN, Michalak K, Klichko VI *et al.* (2009) Peroxiredoxin 5 confers protection against oxidative stress and apoptosis and also promotes longevity in *Drosophila*. *Biochemical Journal*, **419**, 437–445.
- Roesijadi G, Rezvankhah S, Binninger DM, Weissbach H (2007) Ecdysone induction of MsrA protects against oxidative stress in *Drosophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **354**, 511–516.
- Rosner H, Wassermann T, Moller W, Hanke W (2006) Effects of altered gravity on the actin and microtubule cytoskeleton of human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Protoplasma*, **229**, 225–234.
- Selch F, Higashibata A, Imamizo-Sato M *et al.* (2008) Genomic response of the nematode *Caenorhabditis elegans* to spaceflight. *Advances in Space Research*, **41**, 807–815.
- Ubbels GA, Reijnen M, Meijerink J, Narraway J (1994) *Xenopus laevis* embryos can establish their spatial bilateral symmetrical body pattern without gravity. *Advances in Space Research*, **14**, 257–269.
- Vassy J, Portet S, Beil M *et al.* (2001) The effect of weightlessness on cytoskeleton architecture and proliferation of human breast cancer cell line MCF-7. *FASEB Journal*, **15**, 1104–1106.

- Vernos I, Gonzalez-Jurado J, Calleja M, Marco R (1989) Microgravity effects on the oogenesis and development of embryos of *Drosophila melanogaster* laid in the Spaceshuttle during the Biorack experiment (ESA). *International Journal of Developmental Biology*, **33**, 213–226.
- Waddington CH (1961) Genetic assimilation. *Advances in Genetics*, **10**, 257–293.
- Williams KD, Sokolowski MB (2009) Evolution: how fruit flies adapt to seasonal stresses. *Current Biology*, **19**, R63–R64.
- Wilson JW, Ramamurthy R, Porwollik S *et al.* (2002) Microarray analysis identifies *Salmonella* genes belonging to the low-shear modeled microgravity regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 13807–13812.

Authors research is related with altered gravity, particularly microgravity, environmental effects on organisms. Long term exposures to the space environment could have harmful effects that should be further explored in humans and also using model organisms in which high-resolution molecular biology tools are available.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Supplementary online material (SOM) containing additional information about the space experiment timeline, design and related constraints, ground simulation equipment (the random position machine and the MidiCAR cell culture centrifuge), microarray and qPCR analysis additional details and a sum-

mary of the gene ontologies found to be significantly affected in constrained conditions is provided. Also a table with the gene expression ratios of 43 candidate genes is included. The microarrays discussed in this article have been submitted to MIAMExpress with the accession number E-MEXP-2064.

Data S1 Spaceflight-related suboptimal conditions can accentuate *Drosophila* genome-altered gravity response.

Fig. S1 Diagram of the temperature profile and timeline of the ISS experiment.

Fig. S2 The BTU (Biological Transport Unit).

Fig. S3 Pictures of the spaceflight hardware.

Fig. S4 The random position machine and MidiCAR centrifuge from DESC.

Fig. S5 Hierarchical clustering of the different experiments analysed in this study and accession numbers.

Fig. S6 Relations among the 43 genes with a remarkable change in expression (twofold) in at least three of the analysed conditions.

Table S1 Gene ontologies (GO) significantly upregulated or downregulated of the overlapping DEGs on real or simulated microgravity (ISS/RPM) under constrained conditions

Table S2 Fifty probe-sets signal and *P* values from the 43 candidate genes that arose from the Fig. S6 pathway analysis (Included as a separate excel file)

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

***Drosophila* GENE Experiment in the Spanish Soyuz Mission to the ISS: II. Effects of the Containment Constraints**

Raúl Herranz · David A. Laván · F. Javier Medina ·
Jack J. W. A. van Loon · Roberto Marco

Received: 22 February 2008 / Accepted: 15 September 2008 / Published online: 29 October 2008
© The Author(s) 2008. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract In the GENE experiment performed during an 11-day Soyuz Mission to the International Space Station (ISS), we intended to determine if microgravity affects *Drosophila* metamorphosis processes. Control experiments were performed including a 1g ground control parallel to the ISS flight samples and a Random Position Machine microgravity simulated control. A preliminary analysis of the results indicates that five hundred to one thousand genes change their expression profiles depending on the cut-off levels selected. Especially affected among them are the mitochondrial

ones (an example with the respiratory chain is presented). We show here that there is a synergic effect of the constraints introduced to meet the requirements of the space experiment (mainly, a cold step and the use of hermetically closed Type-I containers). The cold transport step to the launch site was introduced to slow down the pupal development. The hermetically closed Type I containers were required to ensure the containment of the fixative (acetone) in the experiment. As shown here, the oxygen concentration inside the container was not optimal but fully compatible with pupal development. It is highly likely that such combined environmental effects will become a common finding in these types of studies as they become more complicated and extensive. They could open the way to understand how the gene expression patterns and the actual phenotypes can adjust to the environment. These findings indicate the importance of a vigorous ground based program in support of real microgravity experiments. Only then we can utilize the ISS in order to understand the consequences of the modified environment in outer space on living organisms.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12217-008-9097-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

In memoriam of Full Professor Roberto Marco who sadly passed away during the preparation of the revised version of this article.

R. Herranz · D. A. Laván · R. Marco
Departamento de Bioquímica-I.I.
Biomédicas “Alberto Sols” (UAM-CSIC),
Madrid, Spain

R. Herranz (✉)
Universidad Autonoma de Madrid Facultad de Medicina,
Arzobispo Morcillo, Madrid CP28029, Spain
e-mail: raul.herranz@uam.es

F. J. Medina
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC),
Ramiro de Maeztu 9, E-28040, Madrid, Spain

J. J. W. A. van Loon
Dutch Experiment Support Center, DESC @
OCB-ACTA-Vrije Universiteit, Amsterdam,
The Netherlands

Keywords Microgravity · *Drosophila* · RPM ·
Random position machine · ISS · International
Space Station · Systems biology · Pupation ·
Affymetrix microarray · Gene expression profile ·
Space biological experiments constrains · Oxygen
limitation · Redundancy and robustness

ESMHint

Performing biological experiments in real microgravity conditions is not an easy task. Gravity is a prevalent

vector on the Earth surface that can not be eliminated, so the use of extraterrestrial devices to study its effects on any system is unavoidable. On ground we can just compensate the gravity force using simulation devices as the Random Position Pachines (RPM; van Loon 2007), or magnetic levitation. Sounding rockets and satellites are available options but at the present moment the International Space Station (ISS) is the best alternative for long duration microgravity research. Nevertheless, the assembly of the whole station remains to be completed and has been exposed to successive delays, which also affected the European Columbus module. After years of delays the module was launched in February 2008.

Apart from political, financial and technological limitations and delays, the design of a biological experiments to be conducted in the ISS have to comply with rigorous safety controls and must be almost automatic, requiring as little of crew time as possible. In October 2003, an 11-day Soyuz Mission (ISS expedition 8) to the station to replace the two-member ISS crew took place. As part of this Spanish Cervantes Scientific Mission (see ref. van Loon et al. 2007 for overview), several biological experiments were performed including the GENE experiment. The experiment samples returned with the Soyuz 7 capsule in dedicated transport boxes after 11 days in real microgravity. In the GENE experiment, we intended to determine how microgravity affects *Drosophila* metamorphosis processes. For this purpose, we have been studying whole genome expression with microarray technologies for *Drosophila* (Adams et al. 2000). Further details about the GENE experiment design have been published previously (Herranz et al. 2007).

The main objective of the present study is to focus on the constraints we encountered for the GENE experiment. Two questions are addressed in this paper:

1. Could we study the 5-day long pupal development period in an 8-day long mission to the ISS?
2. Can the sensibilization of biological systems, using suboptimal conditions of temperature or oxygen for instance, facilitate the identification of the gravity responding group of genes?

This apparently simple GENE experiment, just exposure of pupae to microgravity during a short flight to the ISS, had to meet different constraints in order to be carried out successfully. First of all, it was necessary to deal with the containment requirements associated to the use of fixatives in space. In fact, the preservation of the samples until recovery is performed in conditions already predefined in previous studies (Herranz et al. 2005a). A mild fixative, acetone, in minimal quantities

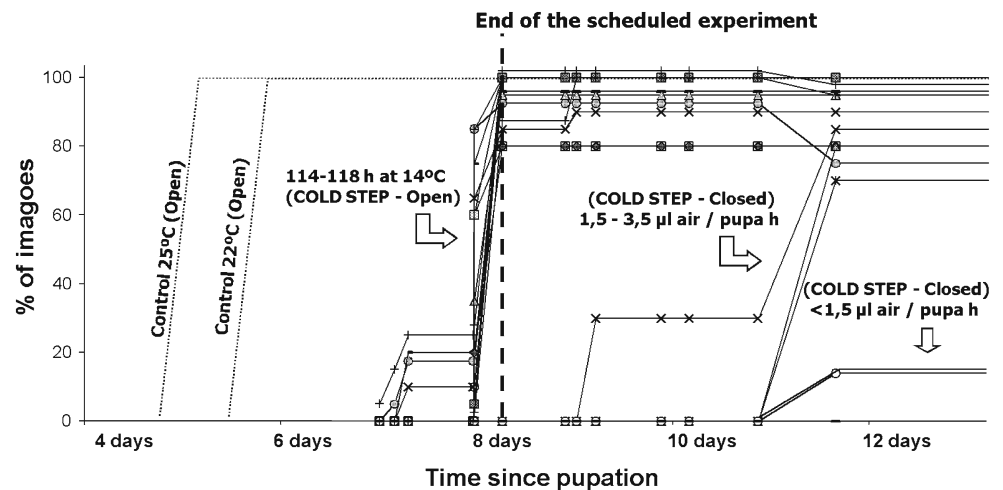
was used. In spite of this, three levels of containment were still required, namely, two plastic bags and the hermetically closed Type-I container (Biorack on D1 1988) that could not be opened at any time during the flight. The container holds an electrically powered motor that can be activated to break tiny glass ampoules containing the acetone included inside the bags, releasing the fixative at the appropriated time. As will be shown in this paper, the modified Type-1 container holds enough oxygen to allow the complete development of the 40 *Drosophila* Oregon R strain pupae enclosed in it. Secondly, since the samples could not be prepared at the launch site, they had to be transported there. Thus it was necessary to slow down the pupal development during transport by exposing them to a lower temperature during five days, the time of the transport from Madrid to Baikonour in the case of the Spanish Soyuz Mission. It turned out that controlling the amount of oxygen available in the hermetically sealed container also extended the period of pupal development. This allowed the recovery of fully developed, black pupae at the end of the experiment, that could eclose into living imagoes if oxygen was again supplied to them. Non black pupae, that could have prematurely died during the flight or have been damaged during the recovery on ground, were discarded avoiding the undesirable effect of excessive developmental asynchronies in the RNA experiments.

In addition to the ISS samples, several control experiments were analysed including a 1g ground control parallel to the ISS flight samples, and one Random Position Machine microgravity simulated control. The RPM experiment reproduced the same constraints as the ISS experiment, although it should be noted that random positioning is only a simulation of real microgravity and has its inherent constraints (van Loon 2007). For the RPM we set a maximum speed between -60 and $+60^\circ/\text{s}$ with random interval and a maximum distance of the samples to the center of 4 cm. This generated a maximum residual acceleration of $10^{-4}g$ (see also van Loon 2007). A second RPM experiment without temperature or oxygen constraints was also run.

Pupal Development is Delayed Under Suboptimal Temperature and Oxygen Concentration

Drosophila, as all insects and invertebrates, is an ectotherm animal (cold blooded) that has no temperature control system like those found in many vertebrates. Life and development occurs optimally at room temperature, but in the case of *Drosophila* can proceed at a wide range of temperatures ranging from $+14^\circ\text{C}$

Fig. 1 Modification of pupal developmental time by the Mission Constraints, temperature (114–118 h cold step) and oxygen limitation (hermetically sealed containers during 192 h)



to +29°C. At temperatures below 20°C, the development of the flies is delayed more and more as lower temperatures are selected, and is almost arrested near 14°C. Lower temperatures may decrease the rate of pupae survival (Lee and Denlinger 1991; Jensen et al. 2007; Qin et al. 2005). Following the scheduled temperature profile of the experiments, the actual temperature during the ISS mission were recorded during transport and in flight. The preparation of the samples in Western Europe (Madrid and Toulouse) and the transportation at 14°C which allowed for arresting nearly all development until launch from Baikonur Cosmodrome in Kazakhstan. This included a cold step of approximately 100 h from preparations in the laboratory until delivery of the samples to the Soyuz integration team, followed by 15 h at 18°C (room temperature conditions) preceding the launch of the Soyuz. In the Soyuz, the samples were installed and remained passively at the same temperature in the cosmonauts' module. Temperature reached 21°C and then fluctuated slowly between 20 and 21°C until the containers were transferred to the ISS Aquarius-2 incubator (van Loon et al. 2007) in the Russian segment adjusted at 22°C. Pupae were allowed to develop for 3.5 days. Then, the two GENE containers were removed by the Spanish astronaut Pedro Duque and inserted in the power supply that activated the acetone release from the ampoules. Containers were introduced immediately in the Kryogen freezer at –22°C in the Russian segment of the ISS. The complete timeline of the experiment was 192 hours.

In Fig. 1, we present experiments that show that pupal development was sufficiently delayed to cope with this 192 h experiment duration. Pupation in *Drosophila* usually lasts 4 to 5 days in optimal conditions, and up to 6 days (135–145 h) at 22°C. The first constraint introduced was a cold transportation step (lasting 4 days).

Keeping the temperature at 14°C can delay and almost arrest, *Drosophila* development until delivery to the Soyuz crew. But in this situation about one in every three imagoes already ecloses on the eighth day, therefore developmental time had to be lengthened. The fact that the hermeticity of the Type-I container limited the amount of air inside the container gave the solution to prevent that some pupae eclosed out before fixation. Thus, somewhat serendipitously, the constraints one has to face in a space flight study may also provide some optimization. If we use a range of 2.0 to 3.5 µl of air for each pupae an hour we gain two to three extra days until the eclosing of the imagoes occurs, without compromising the overall survival of the imagoes. Our experiments were performed using two bags with 20–22 pupae each in a Type-1 container with around 30 ml of free space for air so the amount of air was near 3 µl/pupae h, bringing just the time for the required delay. Thus, both suboptimal temperature and hypoxia conditions were included in our ISS experiment, conditions optimizing the experiment. Since developmental time is normal under these conditions, we did not expect to detect large effects on gene expression associated with these constraints. Just in case, proper controls under the same development conditions but the microgravity exposure were performed, by a parallel 1g on ground control during the mission or during the simulation experiments.

A Ground Simulation Methodology, RPM Provides Results Close to Those Obtained in Real Space Microgravity Sensitized Experiments

RNA was extracted from all samples to test the difference in expression profiles during *Drosophila*

Table 1 Summary of the experiments conditions and results (number of genes that show significantly altered expression levels using a 1.7-fold cut-off value with Bioconductor Software (Benjamini–Hochberg false discovery rate $p < 0.05$ algorithm)

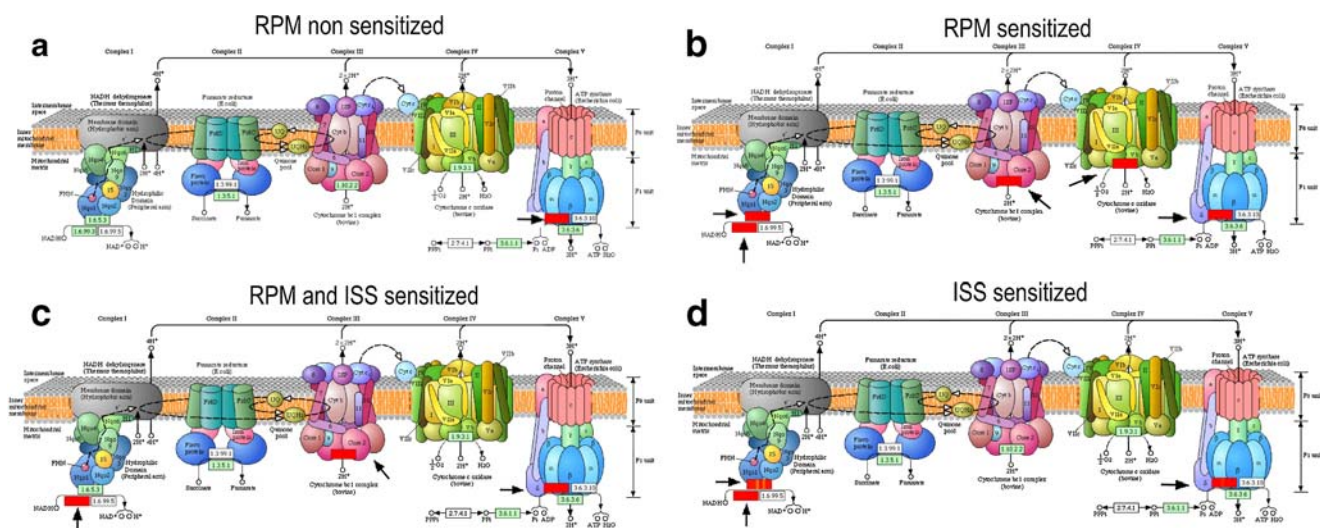
Condition analyzed	Experimental sample	Control sample	Sensitized	Results (genes)
Real microgravity	ISS with constraints	Ground with constraints	Yes	929
Simulated microgravity	RPM with constraints	Ground with constraints	Yes	689
Simulated microgravity	RPM, open at 22°C	Ground, open at 22°C	No	49
Constraints (Temp + Oxygen)	Ground with constraints	Ground, open at 22°C	Control	1082

development with one of the current more powerful technologies, a *Drosophila* complete genome microarray (Affymetrix™ version 1.0; Dalma-Weiszhausz et al. 2006). A validation of the experiment has been carried out using quantitative RT-PCR with twenty genes including the different groups of expression profiles (Supplementary Figure). A summary of the experiments performed is included in Table 1, including real microgravity (ISS) and simulated microgravity (RPM) conditions. It is worthwhile noticing that we have performed experiments in the RPM with and without the temperature/oxygen constraints. A preliminary analysis of the results indicates that five hundred genes change their expression profiles in both real and simulated microgravity. A group especially affected consists of energy related components of the mitochondria (Herranz et al. 2005b). Microarray analyses of the RNAs extracted from flies fixed in the ISS revealed that a relatively large set of genes (15% of the total number assayed) experienced a significant expression change in these conditions. The pre-exposure had an effect

by itself on the overall gene expression observed after pupae development at normal temperature, but the two environmental factors act synergistically (Marco et al. submitted for publication). Similar results have been obtained with RPM simulation. The Mission constraints, including the cold transport step, were found to affect synergistically the response of the simulated microgravity exposure and probably, although not determined because we have not had the opportunity to perform the experiment, on real microgravity (Table 1). It is highly likely that such combined effects of different environmental conditions will become a common finding in this type of studies as they become more complicated and extensive.

Could We Identify a Group of Gravity Responding Genes in These Sensitized Experiments?

An important finding of our experiments, of a more general nature than those just related to space, is the



realization that the effects of the external, environmental parameters can be better detected and studied when the system is sensitized by being far from optimal. This means that the effect of temperature, pressure, anoxia or even the presence of weak hypomorphic mutations, etc can be synergic and useful to characterize the system. Unfortunately, until a new *Drosophila* experiment is selected for being run in the ISS, this concept cannot be explored in real microgravity. We are left with continuing experiments on the ground using low and high gravity simulation approaches. But, how can we deal with the complexity linked to the analysis of overlapping environmental factors?

A systems biology point of view could help us to deal at least partially with this complexity. It is known that in complex systems different input signals can generate similar responses and similar input signals can activate different pathways, always depending on the background steady state of the system. The use of suboptimal conditions could help us to overcome biological system robustness and change the system equilibrium to additional alternative steady state(s) in which changes could be much easier to identify. Just as an example using the data about the gene expression profile in a particular functional system, is shown here the oxidative electron transport phosphorylation chain.

In Fig. 2 A we illustrate affected subunits in the RPM under optimal conditions, *i.e.* in an experiment in non-sensitized conditions. Only one component is up-regulated in simulated microgravity without constraints so we could hardly claim that this cellular process is affected. However, it may well be that just only one of their elements is. In sensitized experiments we observe that several subunits are affected. Although it may well be that not exactly the same in the two conditions (only in the RPM, Fig. 2B, RPM and ISS common affected subunits, 2C, and only in the ISS, 2D). It seems that the microgravity condition, real or simulated, can modify the system expression levels but it does it by acting on different components of the electron transport chain and the ATP synthetase. In our view, the system robustness has been overcome in the two similar but not identical conditions and similar components change but not exactly in the same way. This conclusion is based on a particular cut-off to select the genes that can be considered to be modified. Deciding which cut-off to apply is somewhat arbitrary in the system biology approach. We have started using a different statistical approach based on correlations to overcome this problem (unpublished results).

We should add that the effect triggered by the constraints is not due to the anoxia itself but to the synergism of the different constraints with microgravity,

simulated or real. Two reasons justify this assertion. First, 1g controls developed under the same constraints have been carried out and used in the comparisons. Secondly, from a previously study (Girardot et al. 2004) we have confirmed that the genes detected in this experiment are not related to the genes that change their expression profiles in anoxia conditions, for example, respiratory chain components are barely affected in those experiments.

Concluding Remarks

Performing experiments in space is still not trivial. Technical constraints that are supposed to have little influence on the system could have deep effects on the results, so comprehensive rounds of ground simulation experiments are mandatory before any space mission is actually performed. Moreover, our analyses could open the way to understand how the gene expression patterns and actual phenotypes can adjust to the different environmental conditions. In doing so we have begun to identify the particular set of genes affected by the absence of gravity (Leandro et al. 2007). Magnetic levitation provides a different approach to simulate microgravity on the ground. Experiments equivalent to the GENE protocol using this levitation instrument are in progress. In particular, we are intrigued by the amplification of the expression changes by these treatments when additional constraints in the growing conditions are introduced, such as extreme temperatures, weak hypomorphic mutants that by themselves may not result in strong enough phenotypes. At this point, the effects of containment (limited oxygen, low temperatures, and possible desiccation), in order to overcome the system robustness, may be necessary in order to detect effects due to microgravity.

Acknowledgements The skilful work of the crew of the 8th Soyuz to the ISS mission, including Pedro Duque, in the operation of the procedures in the ISS is gratefully acknowledged. Also the support of the ESA team, in particular Mr Jesús Jiménez, Ms Nathalie Pottier and Mr. Fabrizio Festa was crucial. Dutch Space provided the MAMBA's for the experiment. We also thank Mrs. Aida Villa (UAM, Madrid) and Mrs. Brigitte Eche (GSBMS-CNES, Toulouse, France) for excellent technical assistance during the preparation of the experiments. This work was supported by Grants from the Spanish "Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico" Ref. Nos. ESP2001-4522-PE, and ESP2003-09475-C02-01, and from the Netherlands Institute for Space Research, NWO-SRON, MG-057.

A figure with quantitative RT-PCR validation data has been provided as supplementary material.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

References

- Adams, et al.: The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science. **287**(5461), 2185–95 (2000)
- Biorack on D1: ESA SP-1091. In: Longdon, N., David, V. (eds.) ESA/ESTEC. Noordwijk, the Netherlands (1988) February
- Dalma-Weiszhausz, D.D., Warrington, J., Tanimoto, E.Y., Miyada, C.G.: The affymetrix GeneChip platform: an overview. Methods Enzymol. **410**, 3–28 (2006)
- Gene Spring GX 7.3: Expression analysis. <http://www.agilent.com/chem/genespring> (2007)
- Girardot, F., Monnier, V., Tricoire, H.: Genome wide analysis of common and specific stress responses in adult *Drosophila melanogaster*. BMC Genomics **5**(1), 74 (2004)
- Herranz, R., Husson, D., Villa, A., Pastor, M., Medina, F.J., Marco, R.: Modifications in basic handling techniques to study the consequences of the *Drosophila melanogaster* exposure to the Space environment. J. Gravit. Physiol. **12**(2), 51–60 (2005a)
- Herranz, R., Benguria, A., Fernández-Pineda, E., Medina, F.J., Gasset, G., van Loon, J.J., Zaballos, A., Marco, R.: Gene expression variations during *Drosophila* metamorphosis in Space. The GENE Experiment in the Spanish Cervantes Mission to the ISS. J Gravit Physiol. **12**(1), 253–254 (2005b)
- Herranz, R., Laván, D.A., Benguría, A., Duque, P., Leandro, L.J., Gasset, G., Medina, F.J., van Loon, J., Marco, R.: The “GENE” Experiment in the Spanish Soyuz Mission to the International Space Station. Effects of cold transportation. Microgravity Sci. Technol. **19**(2), 45–49 (2007)
- Jensen, D., Overgaard, J., Sørensen, J.G.: The influence of developmental stage on cold shock resistance and ability to cold-harden in *Drosophila melanogaster*. J. Insect Phys. **53**, 179–186 (2007)
- Leandro, L.J., Szewczyk, N.J., Benguría, A., Herranz, R., Laván, D., Medina, F.J., Gasset, G., van Loon, J., Conley, C.A., Marco, R.: Comparative analysis of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* gene expression experiments in the European Soyuz Flights to the International Space Station. Adv Space Res. **40**(4), 506–512 (2007)
- Lee, R.E., Denlinger, D.L.: Insects at Low Temperature. Chapman and Hall, NY (1991)
- Qin, W., Neal, S.J., Robertson, R.M., Westwood, J.T., Walker, V.K.: Cold hardening and transcriptional change in *Drosophila melanogaster*. Insect Mol. Biol. **14**(6), 607–613 (2005) Dec
- van Loon, J.J.W.A.: Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research. Adv. Space Res. **39**, 1161–1165 (2007)
- van Loon, J.J.W.A., Medina, F.J., Stenuit, H., Istasse, E., Heppener, M., Marco, R.: The National–ESA Soyuz missions Andromède, Marco Polo, Odissea, Cervantes, DELTA and Eneide. Microgravity Sci. Technol. **19**(5/6), 9–32 (2007)

*R. Herranz, D. A. Laván, A. Benguría, P. Duque, L. J. Leandro,
G. Gasset, F. J. Medina, J. van Loon and R. Marco*

The “Gene” Experiment in the Spanish Soyuz Mission to the ISS.

Effects of the cold transportation step

*If exploration of outer space is going to be a major human enterprise in the future, it is important to establish the nature of the biological response to the space environment. In one of the recent Soyuz missions to serve the ISS, the Spanish Soyuz Mission in October 2003, we sent a group of *Drosophila* pupae that underwent almost complete development there. Microarray analyses of the RNAs extracted from flies fixed in the ISS revealed that a relatively large set of genes (15% of the total number assayed) suffered a significant expression change in these conditions. Furthermore, the samples had to be transported to the launch site and it was necessary to slow down their development by exposing them to a lower temperature, fully compatible with pupal development. Such a pre-exposure had*

an effect by itself on the pattern of gene expression observed after pupal development at normal temperature, but the two environmental factors seemed to act synergistically together with the containment in the type I container. These findings indicate the importance of maintaining a vigorous scientific program in the ISS to understand the consequences of the modified environment in outer space on living organisms.

1 Introduction

In the adventure of exploration/colonization of outer space, many biological beings are going to be at least part of life support systems in long-term human bases in near-by planets. On the other hand, it is clear that the living systems are well adapted to the different environmental conditions existing on the Earth. Gravity, although weak, is a constant force acting on all objects on the biosphere and, thus, it is necessary that all living organisms are well adapted to its presence. The case of the plants is paradigmatic, but what about animals? The availability of research opportunities in space has allowed to find out that even microscopic systems are able to sense and respond to the modification in this parameter (reviewed in 1). Paradoxically, large multicellular organisms have been more robust and seem to be able to withstand exposure to strange environments such as those present in the different flying ships in which they have been sent into space. Although some transient modifications have been reported, especially in the case of amphibian development, systems covering almost all the phylogenetic tree have been flown and normal development has been the general outcome of these experiments (2). The International Space Station is the current flight facility to perform microgravity experiments for the new phase of space exploration and colonization.

Authors

R. Herranz, D. A. Laván, L. J. Leandro, R. Marco
Departamento de Bioquímica-I.I. Biomédicas “Alberto Sols”
(UAM-CSIC), Madrid, Spain

A. Benguría
Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)
Cantoblanco, E-28041, Madrid, Spain

P. Duque
ESA, European Space Agency

G. Gasset
GSBMS, Université “Paul Sabatier”, Toulouse, France

F. J. Medina
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)
Ramiro de Maeztu 9, E-28040, Madrid, Spain

J. van Loon
Dutch Experiment Support Center,
DESC @ OCB-ACTA-Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands

2 The experiment background

Drosophila melanogaster is one of the main model systems in current biology. Most of what we know about how animal development occurs has been derived from pioneer research using this organism. The whole sequence of its euchromatic genome was obtained in 2000 (3). The genome sequence completion has made possible that chips incorporating probes to test the expression of a large amount of genes became commercially available for *Drosophila* researchers almost immediately. Thus, we decided to take advantage of this fact and conceived our “Gene” experiment. The experiment intended to study the effects of the space environment on the gene expression pattern of *Drosophila melanogaster* pupae exposed to microgravity during their development. In doing so, we could rely on previous experiments performed in our laboratory to adapt fixation methods to the space conditions (4). Nevertheless, because we could not use the only glovebox that had been previously installed in the ISS, the experiment had to be run inside an ESA type I container to meet the level of containment imposed by the safety measures for toxic fixatives in space. Even the original berlingot concept (5) had to be adapted to the lack of a glovebox. The concept involves putting the samples inside oxygen permeable double plastic bags while the fixative remains inside glass ampoules until the ampoules are broken. Dutch Space had quite recently developed a keen modification of the concept, the MAMBA hardware, “Motorized Ampoule Breaker Assembly”. In a meeting in January 2003 when our experiment was being discussed with the ESA personnel in ESTEC, Dutch Space representatives introduced to us this type of hardware and offered us to use their flight qualified units (see a picture of the

MAMBA in 6). Nevertheless, an important problem remained to be solved: the availability of a power supply to activate the MAMBA containers in the ISS. After some inquiries with representatives of different European space industries including Spanish ones, we decided to accept the offer of Dutch Space to produce such power supply. While these inquiries were advancing, the news of the Columbia accident modified the prospects of our flight. It was clear soon that the Spanish Soyuz Flight was not going to be launched in April but would be delayed. The power supply was ready in June 2003, so that it was launched in the August Progress 12P cargo flight to the ISS, in time for the Spanish Soyuz Mission in October, 2003.

3 The Gene experiment

Twenty *Drosophila melanogaster* Oregon R wild type larvae/early pupae (Fig. 1) were transferred to the centre of a filter paper of the appropriate size to fit in the double bag (3.2 x 10 cm). The larvae were already migrating out of the food and starting pupation but were still easily detached from the plastic wall of the tube and transferred to the filter paper. The glass ampoules were filled with the fixative under low pressure as previously described (5). As many ampoules as possible were laid inside the berlingot. Since each ampoule held 30 µl and 20 ampoules were inserted per berlingot bag, 0.6 ml of acetone was released on the pupae when the ampoules were broken. Two such bags were inserted inside one hermetic MAMBA container.

Due to these constraints, we proposed to limit our experiment to a particular developmental process, namely, *Drosophila melanogaster* pupation. The whole pupation process requires four days at normal room temperature, 22°C. During this time, the animals remain immobile inside the pupal case. They do not require any food, but only oxygen. A second problem arose

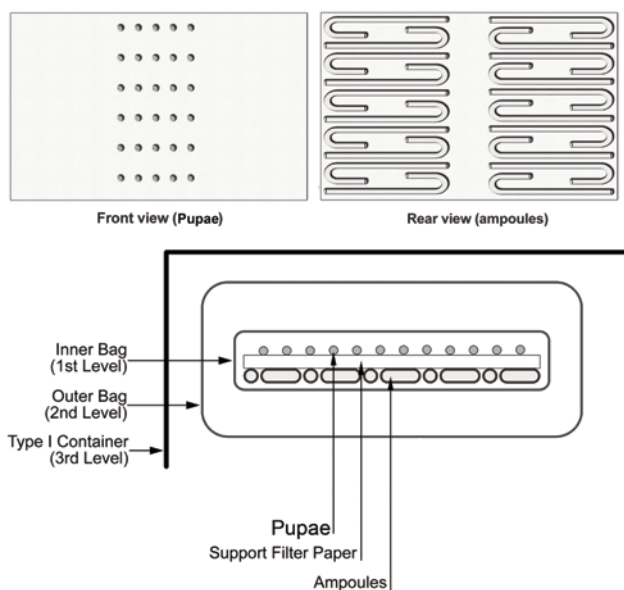


Fig. 1: Berlingot concept adaptation to the Gene experiment.

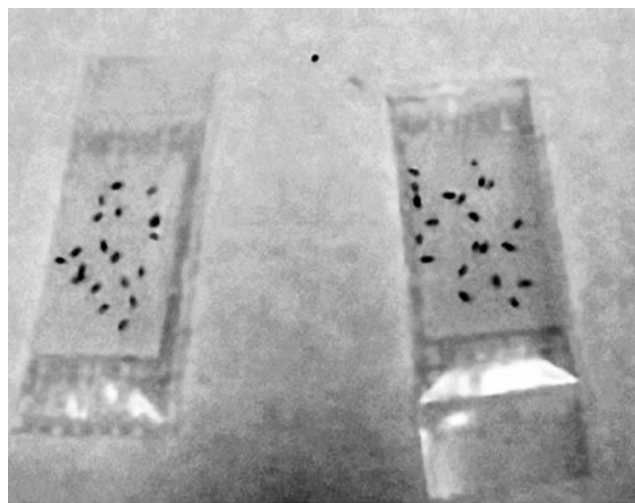


Fig. 2: The *Drosophila* pupae from the ISS experiment after recovery in Moscow.

when we realized that the berlingot preparation process was relatively complicated and required the use of dedicated equipment available in Toulouse, but not easy to be transported to the launch site in Baikonour. We had previously been testing the capability of *Drosophila* to survive at relatively lower temperatures (7). They develop normally but more slowly. Thus, we came to the conclusion that if we could transport the MAMBAS with the berlingots and the pupae prepared in Toulouse at 14°C, we could hand over our experiment the previous night before launch and be able to expose our pupae for three and half days to microgravity at normal temperature. ESA provided one of the thermostated transport containers built by COMAT in France capable of maintaining a fixed temperature during relative long periods of time.

4 Meeting the additional constraints of the experiment

As already mentioned, when the Gene experiment for the Spanish Soyuz Mission was decided, we had already succeeded in adapting several of the methods for *Drosophila* fixation to be used in space. For RNA and protein extraction, the simpler and optimal method has been to expose the animals to dehydrated acetone to remove as much water as possible from the tissues. Acetone dehydration will work through the thick cuticles of the pupae and imagoes. It is a method easy to be adapted to the berlingot concept as explained above. Once the acetone is released exposure of the samples to low temperatures increases the recovery of the RNAs. Therefore, this is what was accomplished in the ISS by Pedro Duque. The results shown in Table I indicate the acceptable quality of the RNA samples for analysing the gene expression changes with microarray technology. The RNA extraction method used Trizol for homogenization and posterior isolation (4).

5 The experiment outline

The actual time line of the experiment was the following. The two Gene containers with the rest of the additional Aging and Root containers were inserted in the Biology Transport Container, delivered in Baikonour and launched in the Soyuz 7 flight to the ISS on October 18, 2003 at 11.37 local time (5.37 GMT). After docking, the containers were transferred to the ISS, where they were inserted in a holder and installed in the Aquarius 2 incubator in the Russian segment at 22°C. On the 21st, at 15.46 GMT, the two Gene containers were removed by Pedro Duque and inserted in the power supply that activated acetone release from the ampoules. At 15.50, the two containers were introduced in the Kryogen freezer at -22°C in the Russian segment of the ISS. They remained there until Monday 27th, when at 17.45 GMT they were brought into the Biology Transfer Box and transferred to the Soyuz 6 capsule that returned to the ground with Pedro Duque and the previous crew in the ISS. Landing took place on October 28 at 2.45 GMT and the containers were immediately transferred back to a trans-

portation box at 3°C to be taken back to Moscow where, at Star City, they were delivered to the scientific team around 16.09 GMT. After moving them to the provisional laboratory set by us there, the containers were open, the pupae removed from the

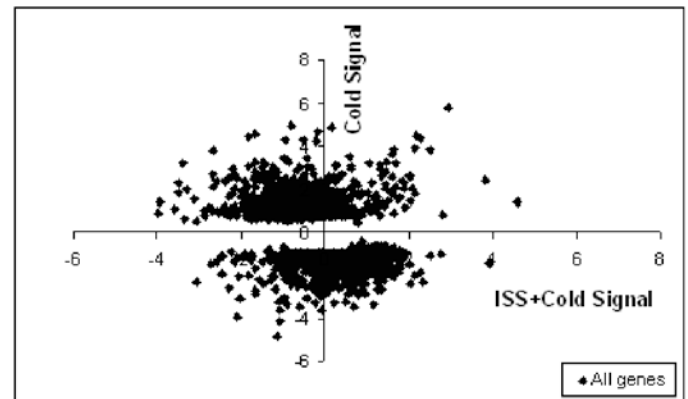


Fig. 3A: Response of the genes in the ISS. In the abscissa, the changes (logarithmic scale) in the microarrays gene expression levels of the space flown samples are plotted compared to the cold transported controls. In ordinates, the expression levels of the cold transport controls compared to the controls at normal room temperature are shown. The genes that do not change significantly upon cold transportation do not appear (empty region in the figure).

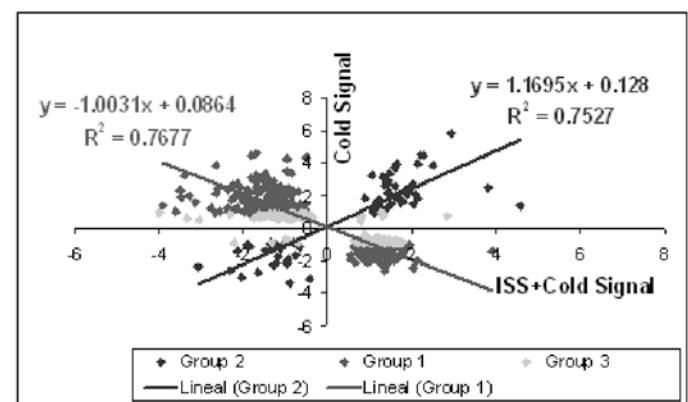


Fig. 3B: Groups of genes significantly responding to the ISS conditions. Group 1. Genes that counteract in space the effect of cold transportation (2nd and 4th quadrants): 327 genes (dark black diamonds in these two quadrants). The line is the regression line through these values. Group 2. Genes that change in the same direction under both conditions, namely, further increasing or decreasing in microgravity (1st and 3rd quadrants): 77 genes (dark black diamonds in these two quadrants). The line is the regression line through these values. Group 3. Genes that do not change significantly by the cold transport and are significantly affected in microgravity: 894 genes (light grey diamonds). They can be assimilated to groups 1 and 2, depending whether they are in the 2nd and 4th quadrant (361+518 genes) or in the 1st and 3rd quadrant (7+8 genes).

Table I. Some reference values that indicate the quality of the RNA samples for the microarrays analysis.

Experimental condition Sample Name	Microgravity on I.S.S.		1g control (for ISS)		1 g control without cold	
	FG3	FG4	GG4	GG5	91	92
Scale factor	2.163	2.028	1.560	1.543	2.709	2.784
Present Probe sets	6041	6406	7231	7470	4989	5493
Present %	43.1%	45.7%	51.6%	53.3%	35.6%	39.2%
Average signal (Present)	811.3	758.7	615.7	569.1	926.9	893.6
3'/5' Ratio (Actin)	2.71	4.84	1.97	1.79	2.68	2.01
3'/5' Ratio (GAPDH)	2.18	3.09	2.02	2.44	2.31	2.01

plastic bags and homogenized in Trizol less than an hour later. The RNAs in the pellets were put on dry ice where they remained until we could flight back to Spain. An almost parallel experiment, using pupae prepared a day later and exposed to 14°C during a similar period of time was performed. After the successful launch, the samples were removed from the low temperature and the ampoules were broken after a similar incubation at 22°C. A similar group of pupae not subjected to this cold transportation step was also fixed after an equivalent time of development and its RNA extracted in the same way.

6 Results of the Gene Experiment

In Figure 3 a representation of genes modified in space vs the changes produced merely by the cold transport itself is shown. When compared to the parallel controls which had undergone the same treatment but the space flight, it turned out that a relatively large amount of genes, more than a thousand, had significant expression level alterations (diamonds in Fig. 3A). Furthermore, when the gene expression patterns in the controls that had been exposed to a similar period of exposure to 14°C as the flight samples (parallel controls) were compared to pupae from the same flies not exposed to this cold step, many genes were also modified by such a treatment. It is interesting to note that both treatments (exposure to 14°C or to the space conditions) had been previously found compatible with a normal development of flies that kept successfully breeding after these treatments. It turned out that the two treatments showed some kind of synergism. In fact, the genes modified by the exposure to the space conditions actually fall into three categories. A) Group 1 of genes (317) that had been previously modified by the cold treatment and that in microgravity were returning to the normal conditions much faster than the samples not exposed to this environmental change (dark black diamonds in the 2d and 4th quadrants in Fig. 3B). B) Group 2 of genes (77) that were modified by the microgravity treatment even more than by the cold treatment alone, i. e., they increased/decreased even more than in the parallel controls (dark black diamonds in the 1st and 3d quadrants in Fig. 2B). The regression line has a slope of 1.17, indicating that the effect of microgravity was stronger than that

of the cold treatment by itself. C) Group 3 of genes (894) not significantly modified by the cold treatment that were changing in microgravity. They can be assimilated to the other two groups since most of them (879) change in opposite direction in both treatments and only 15 (similar to group 2) change in the same direction. There are reasons to believe that the synergism between the two treatments is responsible of the changes in group 2 and possibly also in part, in those in group 3 (the underlying reasons will be analyzed elsewhere, Marco et al, in preparation). In future work, we will analyze how many of the genes affected in space are modified in similar stressful conditions. Finally, we had carried a similar comparison with the genes modified in ICE First, the *Caenorhabditis elegans* experiment run in the DELTA mission (8).

7 The continuation of the analysis

It is not simple to perform experiments in space. Until a new flight opportunity becomes available to us, we are limited to perform experiments in the Ground Simulation Facilities available in our laboratories. This is what we are continuing doing. The results are quite interesting. So far, we have performed similar experiments in the Random Position Machine. The results show that as it has been the case in simpler systems (9 and this volume), the pupae developed in the RPM show a modification of a similar set of genes than in the ISS “Gene” experiment. Moreover, it has been possible to run there an experiment in the absence of a cold transportation step. By doing so, we have begun to identify that there is a particular set of genes that is affected by the absence of gravity. Magnetic levitation provides a different approach on the ground to microgravity. Experiments using this instrumentation equivalent to the Gene experiment are in progress. In particular, we are intrigued by the amplification of the expression changes by these treatments when additional modifications in the growing conditions are introduced, such as extreme temperatures, oxygen restriction, weak hypomorphic mutants that by themselves may not result in a strong enough phenotype, etc.

Acknowledgements

The skillful work of the crew of the Cervantes mission, P.D., Alexander Kaleri and Michel Foale, in the operation of the procedures in flight on board of the ISS is gratefully acknowledged. Also the support of the ESA team, in particular Mr Jesús Jiménez, Ms Nathalie Pottier and Mr. Fabrizio Festa was crucial. Dutch Space provided the MAMBAs for the experiment. We also thank Mrs. Aida Villa (UAM, Madrid) and Mrs. Brigitte Eche (GSBMS-CNES, Toulouse, France) for excellent technical assistance during the preparation of the experiments. This work was supported by Grants from the Spanish “Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico” Ref. Nos. ESP2001-4522-PE, and ESP2003-09475-C02-01, and from the Dutch Space Research Organisation, SRON, MG-057.

References

1. Marco R, Husson D, Herranz R, Mateos J, Medina FJ. *Drosophila melanogaster* and the future of 'evo-devo' biology in space. Challenges and problems in the path of an eventual colonization project outside the earth. *Adv Space Biol Med.* 9:41-81 (2003).
2. Marco R, Benguria A, Sanchez J, de Juan E. Effects of the space environment on *Drosophila melanogaster* development. Implications of the IML-2 experiment. *J Biotechnol.* 27;47(2-3):179-89 (1996).
3. Adams *et al*. The genome sequence of *Drosophilamelanogaster*. *Science.* 287(5461):2185-95(2000).
4. Herranz R, Husson D, Villa A, Pastor M, Medina FJ, Marco R “Modifications in basic handling techniques to study the consequences of the *Drosophila melanogaster* exposure to the Space environment” *J. gravit. Physiol.* 12(2) 51-60 (2005).
5. Tixador R, Raffin J, Richoilley G, Kordium VA, Kojarinov V, Maneko G. Ampoule de verre cassable contenant un liquide sous pression, éjectable en totalité lors de la cassure de l'ampoule. Brevet B. 148 n° 8007471. *Innov. Tech. Biol. Med.* vol. 2, pp. 12-14 (1981).
6. Matía I, Fernández-Camacho F, Marco R, Kiss J, Gasset G, van Loon JJ, Medina FJ. The “Root” experiment of the “Cervantes” Spanish Soyuz Mission: Cell proliferation and nucleolar activity alterations in *Arabidopsis* roots germinated in real or simulated microgravity. *Microgravity. Science & Technology*, Issue XIX-5/6 (2007), 128.
7. Anthony P, Ausseil J, Bechler B, Benguría A, Blackhall N, Briarty LG, Cogoli A, Davey MR, Garesse R, Hager R, Loddenkemper R, Marchant R, Marco R, Marthy HJ, Perry M, Power JB, Schiller P, Ugalde C, Volkmann D, Wardrop. *J Preservation of viable Biological Samples for experiments in Space Laboratories J. Biotechnol.* 47, 377-393 (1996).
8. Leandro LJ Szewczyk NJ, Benguría A, Herranz R, Laván D, Medina FJ, Gasset G, van Loon J, Conley CA, Marco R. Comparative analysis of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* gene expression experiments in the European Soyuz Flights to the International Space Station *Adv Sp. Res.* 40 (4): 506-512 (2007).
9. Leys NM, Hendrickx L, De Boever P, Baatout S, Mergeay M. Space flight effects on bacterial physiology. *J Biol Regul Homeost Agents.* Apr-Jun;18(2):193-9 (2004).

Published in final edited form as:

Adv Space Res. 2007 April ; 40(4): 506–512.

Comparative analysis of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* gene expression experiments in the European Soyuz flights to the International Space Station

L.J. Leandro^a, N.J. Szewczyk^{b,c}, A. Benguría^d, R. Herranz^a, D. Laván^a, F.J. Medina^e, G. Gasset^f, J. van Loon^g, C.A. Conley^b, and R. Marco^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica-I.I. Biomédicas “Alberto Sols” (UAM-CSIC), Madrid, Spain ^bAmes Research Center, NASA, M/S 239–11, Moffett Field, CA 94035–1000, USA ^cDepartment of Biological Sciences, University of Pittsburgh, PA 15260, USA ^dCentro Nacional de Biotecnología (CSIC), Cantoblanco, E-28041 Madrid, Spain ^eCentro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid, Spain ^fGSBMS, Université “Paul Sabatier”, Toulouse, France ^gDutch Experiment Support Center, DESC @ OCB-ACTA-Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands

Abstract

The European Soyuz missions have been one of the main routes for conducting scientific experiments onboard the International Space Station, which is currently in the construction phase. A relatively large number of life and physical sciences experiments as well as technology demonstrations have been carried out during these missions. Included among these experiments are the Gene experiment during the Spanish “Cervantes” Soyuz mission and the ICE-1st experiment during the Dutch “Delta” mission. In both experiments, full genome microarray analyses were carried out on RNA extracted from whole animals recovered from the flight. These experiments indicated relatively large scale changes in gene expression levels in response to spaceflight for two popular model systems, *Drosophila melanogaster* (Gene) and *Caenorhabditis elegans* (ICE-1st). Here we report a comparative analysis of results from these two experiments. Finding orthologous genes between the fruit fly and the nematode was far from straightforward, reducing the number of genes that we could compare to roughly 20% of the full comparative genome. Within this sub-set of the data (2286 genes), only six genes were found to display identical changes between species (decreased) while 1809 genes displayed no change in either species. Future experiments using ground simulation techniques will allow producing a better, more comprehensive picture of the putative set of genes affected in multicellular organisms by changes in gravity and getting a deeper understanding of how animals respond and adapt to spaceflight.

Keywords

Microarrays; Gene expression patterns; Microgravity; International Space Station; *Drosophila melanogaster*; *Caenorhabditis elegans*; European Soyuz missions; Spanish Cervantes mission; Dutch Delta mission

1. Introduction

The International Space Station (ISS) is the current facility designed for use in gathering the critical scientific information required for successful exploration and colonization of space.

*Corresponding author. Tel.: +34 91 397 54 09; fax: +34 91 585 44 01. E-mail address: roberto.marco@uam.es (R. Marco).

One critical scientific question is: How much are organisms affected by changes in gravity? Gravity is one of the fundamental, unchanging, physical parameters on the Earth (Marco et al., 2003). In addition to international involvement in construction and utilization of the ISS, the prevalent idea among the space scientific community was that it would be possible to perform experiments onboard the ISS under conditions similar to those normally found in laboratories on Earth. Today, the hard reality is much less encouraging. The scientific utilization of the ISS has been curtailed by delays in its completion, budgetary overruns, crew limitations, etc. The laboratory facilities are yet quite Spartan. Even when the final European and Japanese modules are installed, the number and complexity of the experiments will remain limited. Critical among these factors are the size of the permanent crew and restrictions in experiment transport and access to the station. These concerns are now amplified as NASA has stated that the Shuttle fleet is too expensive, obsolete and/or unfit for servicing the station as originally planned, namely, every three months.

One Soyuz capsule is permanently attached to the ISS, serving as a lifeboat, providing an emergency escape route for the crew. Initially conceived as an auxiliary facility, the Soyuz capsules are safe and robust, capable of providing shelter and return capability for up to three astronauts. In fact, the limited seating capacity of the Soyuz is one of the reasons why the ISS crew is limited. To assure the continued operability of capsules docked to the ISS, new capsules are launched at regular intervals. Newly launched capsules dock at the second Soyuz bay on the ISS and older capsules return to the ground. Due to the limited capacity, the Soyuz capsule does not provide much cargo space. ISS bound cargo must be shipped by the Shuttle fleet or the unmanned Russian Progress, which has a more limited cargo capacity and lacks the ability to transport large power requiring elements of the ISS (for example the European Columbus or Japanese modules).

During the past five years, the European Space Agency in collaboration with some of its member states has been using these Progress and Soyuz flights to try to implement a research program. These efforts began somewhat tentatively, but have recently become more systematic. Between 2000 and 2006, six European Soyuz missions have been flown: one French (2001), two Italian (2001 and 2005), one Belgian (2002), one Spanish (2003) and one Dutch (2004). The science run during these missions was recently reviewed at a meeting in Toledo and will be published soon (van Loon et al., in press).

During these missions, scientific experiments performed covered both physical and life sciences. During two missions, the Spanish Cervantes and the Dutch Delta missions, experiments were conducted to detect global changes in gene expression of multicellular organisms. The experiments were quite different, but they utilized two of the more important biological model systems available, namely, *D. melanogaster* in the Cervantes mission and the nematode *C. elegans* in the Delta mission. Since the genomes of these two organisms have been sequenced, it is possible to look at orthologues. The aim of this analysis is to analyze the results of both experiments in order to find genes whose expression changed in both organisms during their visits to the ISS.

2. Materials and methods

2.1. The Gene experiment in the Spanish Soyuz mission

The experiment intended to study the effects of the space environment on the gene expression pattern of *D. melanogaster* pupae exposed to microgravity during their development. In doing so, we could rely on previous experiments performed in our laboratory to adapt fixation methods to space conditions (Herranz et al., 2005). Because we could not use an on-board glove box to meet the level of containment imposed by safety for the use of toxic fixatives, the experiment had to be entirely executed, in a completely automatic fashion, inside a closed ESA

type I container. The original Berlingot concept (Tixador et al., 1981) had to be adapted. The Berlingot is a culture chamber inside a small sealed plastic bag with two layers of polyethylene. In the Berlingot design the samples are inside this double-layered plastic bag that also holds glass ampoules containing fixatives (Fig. 1). When the ampoules are broken the fixatives are released. Dutch Space (Leiden, The Netherlands) had developed an automated system which was able to break the glass ampoules at preset times; the MAMBA hardware, “Motorized Ampoule Breaker Assembly”. A power supply had to be built and sent to the ISS in time to be able to activate the MAMBA containers during the Spanish Soyuz mission.

Two MAMBA containers were flown with two bags each. The same number was prepared for the near synchronous ground controls including the cold transportation step (see below) and for a posterior ground control which lacked such a cold transportation step. Due to flight constraints, we had to limit our experiment to a particular developmental process, namely pupation. The whole pupation process requires four days at normal room temperature, 22 °C. During this time, the animals remain immobile inside the pupal case. They do not require any food, only oxygen. The sample preparation process is relatively complicated and required the use of dedicated equipment available in Toulouse, which could not be easily transported to the launch site in Baikonour, Kazakhstan. We had previously shown the capability of *Drosophila* to survive at relatively lower temperatures than usual (Anthony et al., 1996). The animals develop normally but more slowly. This provided the possibility to prepare the experiment in Toulouse (France) and transport the samples, at 14 °C, to the launch site in Baikonour. After launch, the samples were exposed to the microgravity environment at room temperature (smoothly oscillating between 20 and 22 °C in the Soyuz capsule and fixed 22° in the aquarius incubator in the ISS) for three and half days. ESA kindly provided the Yellow Box containers for the cold transportation step.

Twenty *D. melanogaster* Oregon R wild type larvae/early pupae were placed onto the centre of a filter paper of the appropriate size to fit in each Berlingot bag, 3.2 × 10 cm. The larvae were already migrating out of the food and starting pupation but were still easily detached from the plastic wall of the tube and transferred to the filter paper. The glass ampoules were filled with acetone, the fixative used, under low pressure as previously described (Tixador et al., 1981). Twenty ampoules were laid inside each bag. Since each ampoule held 30 µl a total of 0.6 ml of fixative was released on the pupae when the ampoules were broken. By removing as much water as possible from the tissues using acetone we were able to preserve RNA and protein in our samples. Acetone dehydration will work through the thick cuticles of the pupae and imagoes. Once the acetone is released transferring the samples to low temperatures increases the recovery of the RNAs (Herranz et al., 2005). Once the ampoules were broken, the two containers were transferred to the ISS freezer at -22 °C in the Russian Segment. They remained there until the end of the mission, when they were brought into the passive biology transfer box and transferred to the Soyuz TMA-2 capsule that returned to the ground with Pedro Duque and the Expedition S7 crew. The containers were immediately transferred back to a Yellow Box at 3 °C after landing of the Soyuz. The samples were taken back to Moscow area where, at Star city, they were returned to the scientific team close to 12 h after landing. The containers were opened, the pupae removed and homogenized in Trizol, less than one hour later. The RNAs in the pellets were put on dry ice until further processing in our laboratory in Madrid. An almost parallel experiment, using pupae prepared a day later and exposed to 14 °C during a similar period of time as for the actual flight experiment was performed (near synchronous ground control listed above). After the successful launch, the samples were removed from the low temperature and the ampoules were broken after a similar incubation time at 22 °C as in-flight.

2.2. The ICE-1st experiment in the Dutch Soyuz mission

In the next European Soyuz flight, in April 2004, a group of International Laboratories (French, Japanese, Canadian, Americans) coordinated by Dr. Michel Viso from the French Centre National d'Etudes Spatiales (CNES), flew a set of 53 culture bags containing *C. elegans* (Szewczyk et al., submitted for publication). The bags were made of the same material as the Gene experiment bags and housed within the same ESA Type 1 containers. The majority of the ICE-1st Type 1 containers were vented (including the ones containing the animals utilized for the microarray analysis) as they did not contain fixative. The ICE-1st samples were prepared in Toulouse in the same laboratory as the Gene experiment and transported to Baikonour in the same Yellow Boxes. The containers were inserted in the Kubik incubator developed by ESA set at 12 °C during the day immediately preceding the launch in the Soyuz capsule when the temperature in the incubator was raised to 20 °C. After two days the Soyuz docked the International Space Station and the Kubik was transferred to the Station with the nematode samples which were kept at 20 °C for an additional period of 10 days. After landing, the samples were frozen in liquid nitrogen. Two sets of control sets of samples were prepared in the same way, but remained in either Moscow or Toulouse (1 set at each city) until landing of the space samples had taken place. They were treated in a similar way. During the 12 days at 20 °C, the animals were able to develop and produce progeny. Animal growth and development in-flight was normal (Szewczyk et al., submitted for publication), apoptosis proceeded normally in the germ line (Higashitani et al., 2005) no increase in the rate of mutation was noted (Zhao et al., 2006), and altered muscle development with a movement defect was noted upon return to Earth (Higashibata et al., 2006). RNA from three samples (4, 22 and 23) from the experimental containers ICE-08 and ICE-05 was extracted and purified from mixed stage animals as described (Selch et al., submitted for publication). The RNAs were used for microarray analysis using standard laboratory grown samples.

Two approaches were taken in analysing the microarray data. First, a biased approach of examining genes associated with biological relevant processes revealed no changes in gene expression for apoptosis related genes (Higashitani et al., 2005) and decreased expression of a number of “muscle” genes including those that encode MyoD and Myosin Heavy Chain (Higashibata et al., 2006). Second, an unbiased comparison of whole animal, whole genome transcript levels in three samples analyzed on a cDNA system and one sample on the Affymetrix system (Selch et al., submitted Advances in Space Research 2006). The unbiased analysis suggested that each population of worms had population specific changes as well as changes that were conserved between populations. In all, 21 genes displayed increased expression across all four samples and 16 displayed decreased expression. The data suggest that across populations worms display decreased expression of collagen (worm exoskeleton?), neuromuscular elements (including MyoD and Myosin Heavy Chain), and amino acid metabolism encoding genes as well as increased expression of intestinal components (worm equivalent of liver/kidney) and heat shock response genes.

2.3. Comparative gene expression profile analysis

The RNAs obtained from the pooled samples were hybridized to Affymetrix chips for both experiments (cDNA chips were also used for the *C. elegans* experiment). They were processed and analyzed following Affymetrix's recommendations. The equally normalized log 2 ratios of intensity of the hybridization of the space samples vs the ground control ones was used in the comparisons for the two systems, *Drosophila* and *C. elegans*. The chips detect a large number of probe-sets (14,010 for *Drosophila* and 22,625 for the nematode). Nevertheless, only a subset of orthologue genes can be identified in both systems. Using the Affymetrix software, it is possible to compare a relative large number of genes using the Affymetrix database. First we identified in the Affymetrix database the equivalent name of the wormbase ID gene names given in the ICE-1st analysis. Then we found the orthologue in the *Drosophila* genome as

given by Affymetrix. As indicated below, this search did not cover the whole list of genes, probably due to the current annotation situation in both systems. Only approximately 20% of the genes in the ICE-1st chip could be identified as having *Drosophila* orthologues in the Affymetrix database and therefore could be compared. This limitation has to be kept in mind when evaluating the information given below. The results described in the following section correspond to this subset of genes.

3. Results

3.1. Similarities and differences in the gene expression profiles between *D. melanogaster* and *C. elegans* experiments

To establish the similarities and differences we employed two initial approaches and a third, complementary attempt. The reason for these different methods is that the only way to compare the results is to look into those genes that we can identify as orthologues.

The first approach was to take the normalized data obtained in the microarray analysis of the Gene experiment (Marco et al., in preparation) and to compare them to the normalized data of the ICE-1st experiment (Selch et al., submitted for publication). The second approach was to take the list of the genes that had been found to give a significant difference between the flight and the synchronous ground control in the *C. elegans* ICE-1st experiment and to look into the behaviour of their *Drosophila* orthologues in the Gene experiment. Finally, we tried to identify among the *Caenorhabditis* genes the orthologues of the genes that Beckingham's group had found to be affected in a genetic search in *Drosophila* identifying mutants with an altered geotropic response (Armstrong et al., 2006).

In the first approach, we started with the collection of *C. elegans* genes that produced reproducible, reliable data in the ICE-1st microarray data, namely 13,596 genes. For only 2277, (almost exactly 20%), we could identify the corresponding *Drosophila* orthologues be identified. Selch et al had used three different samples from the Delta Soyuz mission and analyzed them both independently and pooled. We decided to pool the data from the three samples as we had done with the *Drosophila* Gene samples and to compare the degree of variation against the controls. In Fig. 2a we can see plotted the results of such a comparison. As can also be seen in Table 1, the majority of *Drosophila* and *Caenorhabditis* orthologue genes only give relatively small changes, less than 2-fold up or down in both experiments. Moreover, they are similarly distributed among the four quadrants, indicating that there are little hints that they may be changing expression values in the same direction in both experiments. The same conclusion can be reached if we only plot the genes that give at least 2-fold changes in the ICE-1st and in the Gene experiment (Fig. 2b). Only six genes decreased both in the Gene and in the ICE-1st experiments (3d quadrant) and none increased (1st quadrant). The actual magnitude of the changes showed little correlation among the two sets. A few more (Table 1) did move oppositely in both experiments and the magnitude of the changes gave higher correlation values (2nd and 4th quadrants) but the relatively low cut-off utilized and the low number of genes made us to disregard this negative correlation.

In the second approach, we started with the set of genes that had been suggested to be altered in the ICE-1st space experiment with *C. elegans* (Selch et al., submitted for publication). They choose a more restricting criterium, namely, those genes that differed four-fold in expression between the flight and the ground control (28 up and 23 down in sample 4, 25 up and 28 down in sample 22, 16 up and 23 down in sample 23). Only a handful of these genes were actually detected at the same time in the three replica samples (21 up and 16 down across the three populations). From this last group of genes, only 9 genes were among those that orthologues in *D. melanogaster* were identifiable in the Affymetrix data base, roughly again 20% of the initial list of genes. In Fig. 3, we plotted the expression changes in the Gene vs the ICE-1st

experiment. Some of the genes had more than one potential orthologue form in the *Drosophila* Gene experiment, therefore, more than one dot appears in the case of four of the genes. The conclusion is the same, almost none of these genes changed significantly in the same direction in both of the experiments (Table 2).

Finally, among the genes found to respond to changes in gravitaxis on the ground by the Beckingham's group (Armstrong et al., 2006) none of them was among the orthologue gene list between *Caenorhabditis* and *Drosophila*.

4. Discussion

While it is true that both experiments were able to show that multicellular organisms respond to the space environment by modifying the expression levels of a relatively large set of genes (Marco et al., in preparation; Selch et al., submitted for publication), the comparisons in this study fail to identify a common set of genes for the two main invertebrate model systems, *C. elegans* and *D. melanogaster*. It can be thought surprising that there is little overlap between the two experiments as one might suspect a common group of genes respond to the microgravity environment. On the other hand, there are many differences in the experimental design that may be responsible for this apparently negative result.

First of all, it has been shown in the case of the *Drosophila* system that the cold exposure in the transport phase to the launching site synergistically increased the microgravity response in this system (Marco et al., in preparation). No such an effect has been reported for the *C. elegans* system. On the one hand, *C. elegans* is more resistant than *Drosophila* to low temperatures of the magnitude used in this experiment. On the other, the *C. elegans* animals had been maintained almost 12 days, at the normal temperature of 20 °C, much longer than the *Drosophila* experiment, giving more time for quenching down of any potential synergistic effects in *Caenorhabditis*.

Additional reasons for the difference can be found. The *Drosophila* experiment limited the exposure to microgravity to strictly synchronized samples during the pupal stage. The pupae are immobile inside their case and do not respond to changes in the gravity vector in ways similar to *Drosophila* imagoes or to *C. elegans* adults. The development of holometabolous organisms is logically different from the development of organisms such as the nematode. The *C. elegans* samples were, in this sense, a mixture of organisms at different levels of development. Almost 50% of the animals were mature adults and the other half was at different stages of development. Finally, the *C. elegans* samples were frozen on the ground after the experiment had been retrieved from space. The *Drosophila* pupae were fixed in the International Space Station, two and half days after launch and three after the cold transportation step had been completed. Finally, the set-up of the experiments is not exactly the same; in particular, there are differences between the MAMBAs and berlingots in the *Drosophila* experiment and the configuration of the ICE-1st experiment described above.

Thus, the idea that there may be a group of genes responding to the microgravity environment remains to be explored in more detail. More information in more strictly comparable conditions should be obtained. The Gene experiment is now being continued using ground simulation equipment, such as the random position machine (RPM) and magnetic levitation while the *C. elegans* results are being confirmed with another flight onboard the ISS. We already know that the *Drosophila* pupae respond almost identically to the neutralization of gravity achieved by the exposure to the RPM than what had been previously found in the International Space Station. Even the synergistic effect of the cold transport step has been reproduced on the ground conditions (Marco et al., in preparation). Running more experiments using these tools, complementary to the more expensive space experiments, could provide the background to

make more direct proposals for future missions where the two key model systems can be compared.

A final point is the difficulty in deciding the potential orthologues of the genes responding to a similar parameter among different sequenced species. The availability of a specific bio-informatics tool capable of automatically doing so would be of great help for future comparisons and critical to the establishment of gene sets that can be connected with particular phenotypic properties of the organism(s).

Acknowledgments

The support of the all organizations and people involved in the Cervantes and Delta missions, the Spanish Space Program (Spanish Ministry of Education and Science), the Dutch Space Program, ESA, the CNES and NASA that made possible this work is gratefully acknowledged.

References

- Anthony P, Ausseil J, Bechler B, Benguría A, Blackhall N, Briarty LG, Cogoli A, Davey MR, Garesse R, Hager R, Loddenkemper R, Marchant R, Marco R, Marthy HJ, Perry M, Power JB, Schiller P, Ugalde C, Volkmann D, Wardrop J. Preservation of viable biological samples for experiments in Space laboratories. *J. Biotechnol* 1996;47:377–393. [PubMed: 8987576]
- Armstrong JD, Texada MJ, Munjaal R, Baker DA, Beckingham KM. Gravitaxis in *Drosophila melanogaster*: a forward genetic screen. *Genes Brain Behav* 2006;5:222–239. [PubMed: 16594976]
- Herranz R, Husson D, Villa A, Pastor M, Medina FJ, Marco R. Modifications in basic handling techniques to study the consequences of the *Drosophila melanogaster*. *J. Gravit. Physiol* 2005;1251–1260.
- Higashibata A, Szewczyk NJ, Conley CA, Imamizo-Sato M, Higashitani A, Ishioka N. Decreased expression of myogenic transcription factors and Myosin Heavy Chains in *Caenorhabditis elegans* muscles developed during spaceflight. *J. Exp. Biol* 2006;209:3209–3218. [PubMed: 16888068]
- Higashitani A, Higashibata A, Sasagawa Y, Sugimoto T, Miyazawa Y, Szewczyk NJ, Viso M, Gasset G, Eche B, Fukui K, Shimazu T, Fujimoto N, Kuriyama K, Ishioka N. Checkpoint and physiological apoptosis in germ cells proceeds normally in spaceflown *Caenorhabditis elegans*. *Apoptosis* 2005;10:949–954. [PubMed: 16151630]
- Marco R, Husson D, Herranz R, Mateos J, Medina FJ. *Drosophila melanogaster* and the future of ‘evo-devo’ biology in space. Challenges and problems in the path of an eventual colonization project outside the earth. *Adv. Space Biol. Med* 2003;9:41–81. [PubMed: 14631629]
- Selch F, Higashibata A, Imamizo-Sato M, Higashitani A, Ishioka N, Szewczyk NJ, Conley CA. Genomic Response of *C. elegans* to spaceflight. *Adv. Space Res.* submitted for publication
- Szewczyk NJ, Tillman J, Conley CA, Granger L, Segalat L, Higashitani A, Honda S, Honda Y, Kagawa H, Higashibata A, Fujimoto N, Kuriyama K, Ishioka N, Fukui K, Baillie D, Rose A, Gasset G, Eche B, Chaput D, Viso M. Description of International *Caenorhabditis elegans* experiment first flight (ICE-FIRST). *Adv. Space Res.* submitted for publication
- Tixador R, Raffin J, Richoilley G, Kordium VA, Kojarinov V, Maneko G. Ampoule de verre cassable contenant un liquide sous pression, éjectable en totalité lors de la cassure de l’ampoule. Brevet B. 148 no 8007471. *Innov. Tech. Biol. Med* 1981;2:12–14.
- van Loon JJ, Medina FJ, Marco R. “Experiments in the European Soyuz missions to the International Space Station (2001–2005)”. *Microgravity Sci. Technol.* (special issue) in press
- Zhao Y, Lai K, Cheung I, Youds J, Tarailo M, Tarailo S, Rose A. A mutational analysis of *Caenorhabditis elegans* in space. *Mutat. Res* 2006;601:19–29. [PubMed: 16765996]

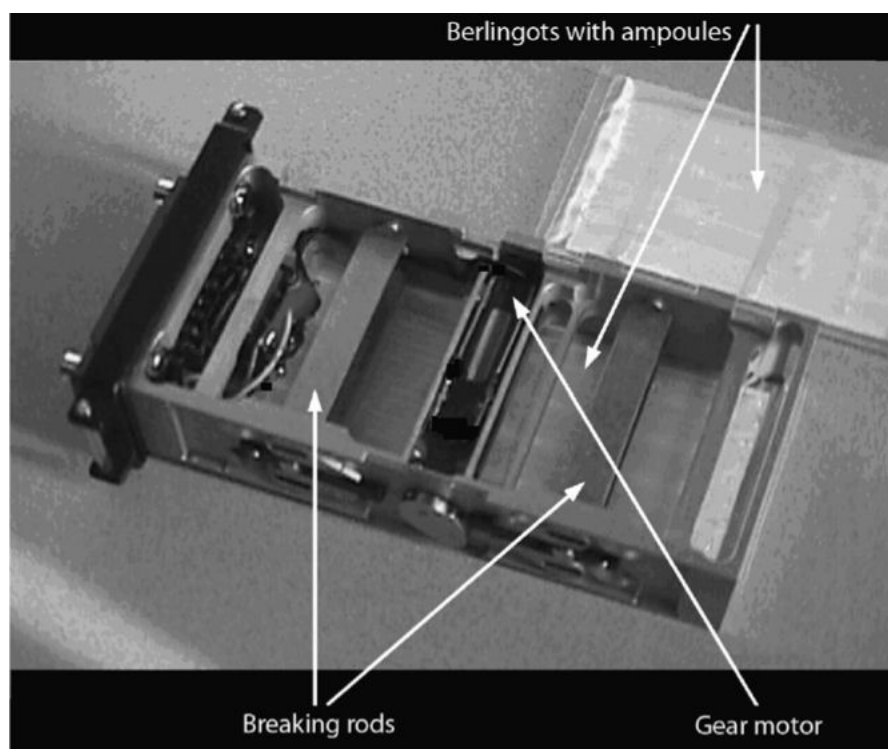
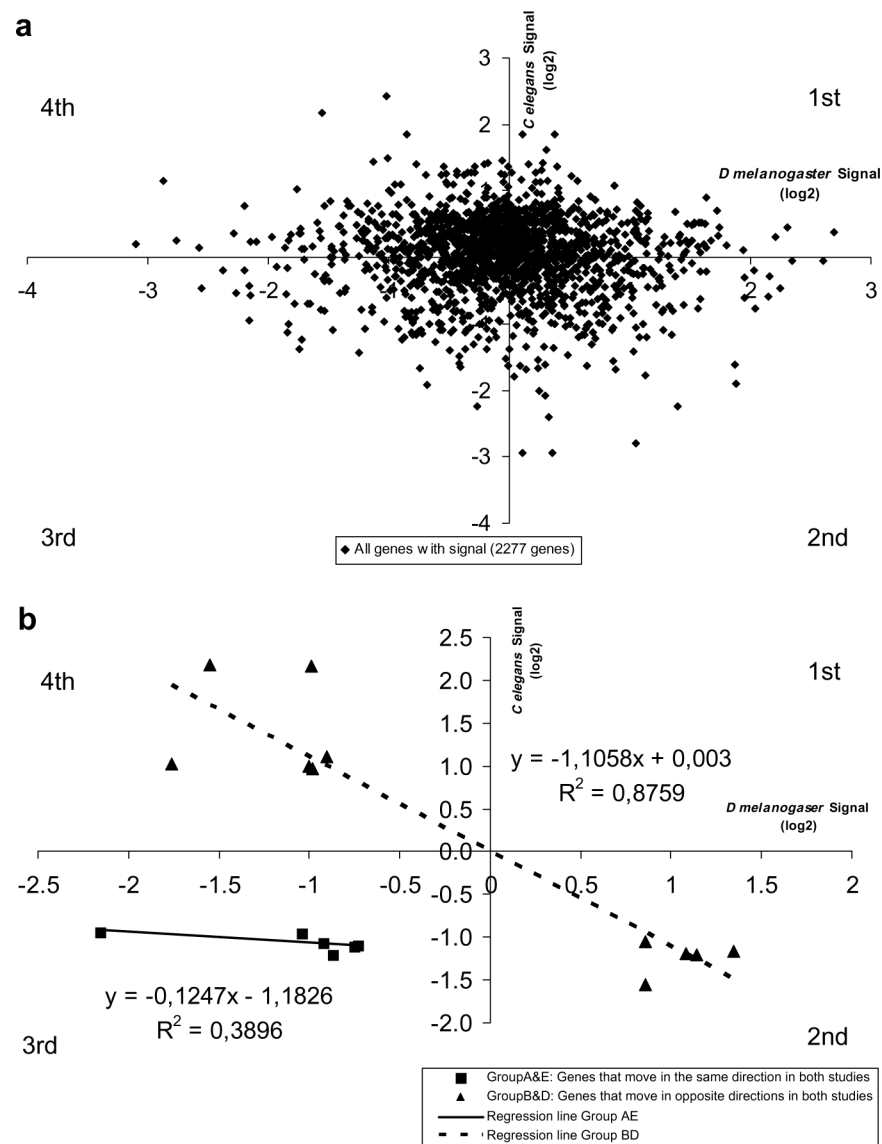
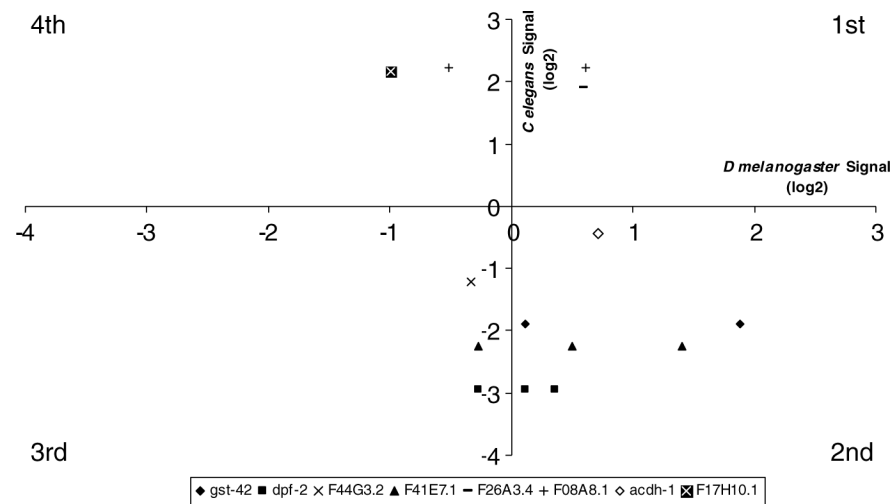


Fig. 1. The Berlingot and the MAMBA concepts included in a Type I container are shown. The dimension of the type I container is $9 \times 4 \times 2$ cm.

**Fig. 2.**

(a) The genes for which orthologues have been found between *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* are plotted indicating their relative changes (log 2 ratios) in the International Space Station. *Drosophila* Gene (abscissa) and *Caenorhabditis* ICE-1st (ordinates) against their respective controls. Being log 2 ratios positive values indicate that these genes are up-regulated in space, while negative values correspond to down-regulated ones. The number of genes in the different quadrants is as follows: 1st 590, 2nd 456, 3rd 475 and 4th 750. Twelve genes lay on the abscissa axis and three on the ordinates one. (b) The same plot limited to the genes that give relative changes of at least of ≈ 1.7 -fold in both experiments. Most of them change in opposite directions. Only five decrease in both systems but with a weak correlation line. None increase.

**Fig. 3.**

The correlation among the genes identified in *Caenorhabditis* experiment (Selch et al., submitted for publication) as giving a large response in space, at least 4-fold increase and decrease, and the changes in the Gene experiment of their *Drosophila* orthologues. Only those found as orthologues are plotted. The points marked with the same type of symbols, correspond to genes that can be correlated with different *Drosophila* ID gene numbers that show differences in relative expression.

Table 1

Number of orthologue genes in the total identified 2286 genes distributed in the different categories in the Gene experiment and in the ICE-1st

	ISS <i>D. melanogaster</i> increase	ISS <i>D. melanogaster</i> decrease	ISS <i>D. melanogaster</i> no change
ISS <i>C. elegans</i> increase	Group A (1st quadrant): 0 genes	Group B (4th quadrant): 9 genes	Group C: 80 genes
ISS <i>C. elegans</i> decrease	Group D (2nd quadrant): 5 genes	Group E (3rd quadrant): 6 genes	Group F: 125 genes
ISS <i>C. elegans</i> no change	Group G: 118 genes	Group H: 134 genes	Group I: 1809 genes

A relatively low cut-off of ≈ 1.7 -fold (increase or decrease) was used in reaching these numbers.

Table 2

Gene ontology of the 6 genes that do show at least ≈ 1.7 -fold decreases and can be identified in both experiments (3d quadrant of Fig. 2b)

<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	Predicted function
T04F8.2	CG9304	Unknown
F10E7.4 (spon-1)	CG6953 (fat-spondin)	Cell adhesion//fat-spondin-like protein
C01B7.4 (tag-117)	CG31243 (cpo) CG32717 (sdt) CG1864 (Hr38)	Postsynaptic scaffolding-like protein
F35H12.4	CG7004 (fwd)	Phosphatidyl kinase like protein
F31F6.6 (nac-1)	CG3979 (Indy)	Sodium sulphate membrane transporter like protein
F13D12.2 (ldh-1)	CG10160 (ImpL3)	Lactate dehydrogenase